



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**IZOLACE LIGNINU Z HROZNOVÝCH SEMEN A JEHO  
APLIKACE JAKO PLNIVA PRO  
POLYHYDROXYALKANOÁTY (PHA)**

ISOLATION OF LIGNIN FROM GRAPE SEEDS AND ITS APPLICATION AS FILLER FOR  
POLYHYDROXYALKANOATES (PHA)

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Pavel Vostrejš**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

**BRNO 2020**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1454/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Bc. Pavel Vostrejš**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Izolace ligninu z hroznových semen a jeho aplikace jako plniva pro polyhydroxyalkanoáty (PHA)

### Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na dané téma.
2. Izolace ligninu z hroznových semen a jeho charakterizace.
3. Příprava PHA/lignin kompozitů.
4. Testování a modifikace mechanických vlastností kompozitů.

### Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Pavel Vostrejš  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá přípravou polymerních filmů z polyhydroxyalkanoátů (PHA) a jejich modifikací přídavkem ligninu jako aktivního aditiva. Motivací bylo vytvořit materiál s potenciálním využitím jako aktivní obal potravin. Polymerní filmy byly připraveny z čistého krystalického poly(3-hydroxybutyrátu) (P3HB) nebo ze směsi krystalického P3HB a amorfního polyhydroxyalkanoátu (P3HB/PHA). Aplikovaný lignin byl izolován z hroznových semínek, které jsou odpadním produktem ve vinařském průmyslu. Izolovaný lignin byl dále upraven acetylací za účelem zlepšení jeho rozpustnosti v chloroformu. Lignin byl charakterizován stanovením prvkového složení, minerálních látek a infračervenou spektroskopií (FTIR). Dále byla metodou FTIR potvrzena úspěšná acetylace ligninu. Lignin byl přidán jako aktivní aditivum v koncentraci, 1, 5 a 10 % do P3HB a P3HB/PHA filmů připravených rozpouštěním v chloroformu. Byly testovány termální a mechanické vlastnosti polymerních filmů s ligninem a bez ligninu. U P3HB filmů nebylo zaznamenáno zlepšení mechanických vlastností přidáním ligninu. Avšak u směsného polymeru P3HB/PHA došlo u filmů s ligninem k výraznému zlepšení Youngova modulu a pevnosti v tahu. Naopak aplikace acetylovaného ligninu se pro zlepšení mechanických vlastností neosvědčila. Termální vlastnosti byly hodnoceny pomocí metod diferenční skenovací kalorimetrie a termogravimetrie. Bylo zjištěno, že lignin zvýšil tepelnou stabilitu PHA filmů a byl potvrzen jeho účinek jako nukleačního činidla. Funkci aktivního obalu zajišťoval lignin svými antioxidačními vlastnostmi, které byly prokázány ABTS testem. Dále byly ověřeny bariérové vlastnosti. Připravený materiál vykazoval v porovnání s běžně používanými polymery velmi dobré hodnoty.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Polyhydroxyalkanoáty, Poly(3-hydroxybutyrát), lignin, mísení polymerů, plniva, aktivní potravinové obaly

## **ABSTRACT**

This diploma thesis deals with 1) the preparation of biodegradable polymer films based on polyhydroxyalkanoates (PHA) and 2) their modification by lignin as an active additive. The motivation for this work was to prepare active packaging material for food packaging. Polymer films were prepared by blending of neat crystalline poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) and amorphous polyhydroxyalkanoate (PHA). The lignin was isolated from grape seeds derived from grape pomace. The solubility of lignin in chloroform was improved by acetylation. The properties of the isolated lignin were determined by elemental analysis, ash content, and infrared spectroscopy (FTIR). Lignin was used as an active additive for the modification of polymeric films prepared by solution casting of P3HB or P3HB blended with amorphous polyhydroxyalkanoate.

The effect of different concentrations of lignin in the range of 1 to 10 % was tested. The lignin type and concentration had a different influence on the final thermal and mechanical behaviour of polymeric films. Lignin increased the values of the Young modulus and tensile strength of the prepared films. Differential scanning calorimetry data confirmed that lignin positively modified crystallization kinetics of P3HB. Thermogravimetry was used to analyse the thermal stability of PHA films. Lignin markedly increased the thermal stability of PHA films. However, acetylated lignin harms the mechanical properties of films.

Moreover, this work showed that lignin isolated from grape seeds and added into PHA films proved its high antioxidant capacity. PHA films with lignin displayed much better gas barrier properties compared with PHA films without lignin. The prepared bioactive PHA films fulfil the requirements for sustainable food packaging with high antioxidant capacity and excellent gas barrier properties.

## **KEYWORDS**

Polyhydroxyalkanoates, poly(3-hydroxybutyrate), polymers blending, fillers, lignin, active food packaging

VOSTREJŠ, Pavel. *Izolace ligninu z hroznových semen a jeho aplikace jako plniva pro polyhydroxyalkanoáty (PHA)*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123782>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

### *Poděkování:*

*Velmi rád bych poděkoval své vedoucí diplomové práce paní doc. Ing. Adriáně Kovalčík, Ph.D., za veškerou pomoc, podporu, cenné rady, za věnovaný čas a odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D., Julienu Jaxelovi, MSc., Leoně Kubíkové, Ing. Michalu Machovskému, Ph.D. a paní laborantce Lence Somrové za pomoc při provádění experimentů. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat za podporu a poradenství Karolíně Bořánkové.*

*Tato práce byla podpořena projektem SoMoPro (projekt č. 6SA18032). Projekt získal finanční prostředky z programu pro výzkum a inovace Horizont 2020 Evropská unie v rámci akcí Marie Skłodowská-Curie a je spolufinancován Jihomoravským krajem dle grantové dohody č. 665860. Poznámka: Tento materiál odráží pouze postoje autora a EU není zodpovědná za jakékoli použití prezentovaných informací.*



Jihomoravský kraj



Jcmm

SO-MO-PRO-

## OBSAH

<b>1.</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>9</b>
2.1.	Balení potravin .....	9
2.1.1.	Plastové obaly.....	10
2.2.	Cirkulární ekonomika.....	14
2.3.	Biodegradovatelné plasty a bioplasty.....	15
2.4.	Polyhydroxyalkanoáty .....	17
2.4.1.	Plastifikátory .....	24
2.4.2.	Mísení polymerů v tavenině .....	25
2.4.3.	Chemické modifikace.....	27
2.5.	Odpad z vinařského průmyslu .....	29
2.5.1.	Extrahovatelné látky .....	30
2.5.2.	Další způsoby zpracování.....	32
2.6.	Lignin .....	32
2.6.1.	Metody izolace ligninu .....	33
2.6.2.	Delignifikační metody .....	34
2.6.3.	Konverzní metody .....	35
2.6.4.	Antioxidační vlastnosti ligninu .....	36
2.7.	Motivace práce .....	36
<b>3.</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>38</b>
3.1.	Použité přístroje.....	38
3.2.	Použité chemikálie .....	38
3.3.	Biologické suroviny .....	38
3.4.	Izolace ligninu .....	38
3.5.	Charakterizace ligninu.....	39
3.5.1.	Stanovení popela .....	39
3.5.2.	Prvková analýza .....	39
3.5.3.	Měření FTIR.....	40
3.6.	Příprava PHA filmů.....	40
3.7.	Charakterizace PHA filmů .....	40
3.7.1.	Bariérové vlastnosti .....	40
3.7.2.	Stanovení antioxidační aktivity .....	41

3.7.3.	Studium termálních vlastností kompozitních filmů .....	41
3.7.4.	Charakterizace mechanických vlastností kompozitů .....	41
3.8.	Statistické vyhodnocení.....	42
<b>4.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>43</b>
4.1.	Popel.....	43
4.2.	Prvková analýza .....	43
4.3.	FTIR .....	44
4.4.	Bariérové vlastnosti.....	46
4.5.	Antioxidační aktivita .....	46
4.6.	Diferenční skenovací kalorimetrie .....	47
4.7.	Termogravimetrická analýza .....	49
4.8.	Mechanické vlastnosti .....	50
<b>5.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>59</b>
<b>7.</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>81</b>

## 1. ÚVOD

Plastové obaly potravin jsou každodenní součástí našich životů, které nám ulehčují manipulaci s potravinami a také je chrání proti znehodnocení. V dnešní době jsou nenahraditelné, ale představují značnou enviromentální zátěž pro naši planetu. Většina z nich je použita pouze jednorázově a spotřeba plastů každoročně roste. V rámci udržitelného rozvoje existuje snaha nahradit konvenční plasty ekologičtějšími materiály. Polyhydroxyalkanoáty (PHA) patří mezi kompostovatelné biopolymery produkované biotechnologickou cestou, které mají potenciál konvenční plasty vyráběné z ropy nahradit. Jejich širšímu využití ale brání limitující termální a mechanické vlastnosti nebo vysoké produkční náklady. Existuje celá řada možností, jak tyto nevýhody zmírnit nebo odstranit, ať už se jedná o snížení produkčních nákladů využitím odpadních materiálů z potravinářství nebo ovlivnění vlastností PHA.

Jednou z variant modifikace PHA je příprava směsí polymerů. Poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB) je vysoce krystalický polyester. Vysoký stupeň krystalinity je příčina jeho křehkosti. Avšak mísením s jiným polymerem může být získán materiál s nižší krystalinitou a vyšším prodloužením v tahu. Další možností modifikace polymerních materiálů je přidavek plniva nebo aditiv. Na výběr je spousta různých plniv a aditiv od anorganických jíílů po biopolymery jako celulóza nebo lignin. Lignin představuje biopolymer, který je všudypřítomně dostupný, ale není výrazně využíván. Jeho izolaci z hroznových semínek, která jsou odpadním materiálem vinařského průmyslu, by došlo k valorizaci odpadu a jeho využití ke zlepšení vlastností PHA.

Byly provedeny výzkumy zabývající se modifikací PHA ligninem, avšak nebyla souhrnně popsána modifikace PHA filmů ligninem izolovaným z hroznových semínek a jeho účinky na mechanické, termální, antioxidační vlastnosti a propustnosti, tedy charakterizace důležitých vlastností polymerního materiálu s potenciálním využitím jako potravinový obal.



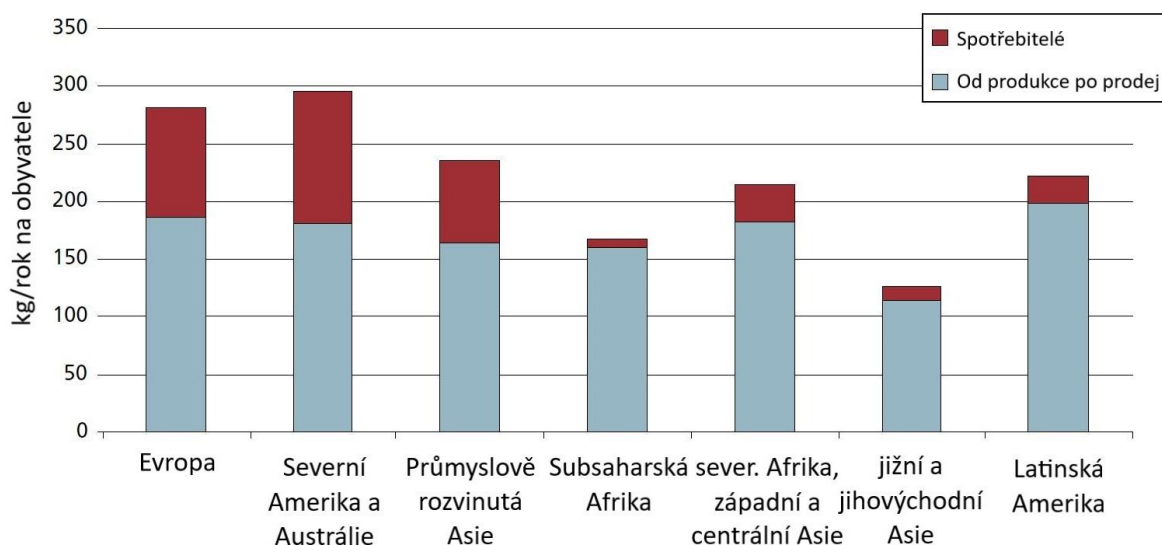
## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Balení potravin

Obalový průmysl představuje v dnešní době nezbytnou součást výroby většiny produktů, výjimkou není ani potravinářský průmysl. Potravinové obaly tvoří asi polovinu všech produkováných obalů [1].

Balení potravin má celou řadu funkcí. Hlavní funkcí je ochrana potravin, tedy zvýšení udržitelnosti, zachování jejich kvality během procesu transportu z výroby ke koncovým zákazníkům zahrnující i skladování potravin. Mezi další funkce patří vytvoření racionální manipulační jednotky, odpovídající logistickým požadavkům, a v neposlední řadě obal slouží jako prostředek vizuální komunikace se zákazníkem. Plocha obalu poskytuje prostor pro spotřebitelský marketing a zároveň zde výrobce plní své zákonné povinnosti uvádět informace o výrobku [2].

Význam obalu stoupá se zvyšující se vzdáleností místa výroby potravin od místa konzumace a s prodlužující se dobou mezi vyprodukováním potravin a její konzumací. Zároveň se zvyšují i požadavky na tyto obaly [3]. V rozvojových zemích, kde nejsou k dispozici moderní průmyslové obalové technologie, představují ztráty potravin během zpracování a balení až čtvrtinu veškerých ztrát. Proti tomu v západních zemích je největším problémem plýtvání s potravinami na straně konzumentů, tyto ztráty dosahují až 40 % vyprodukovaných potravin, jak je vidět na obrázku 1 [4].



**Obrázek 1 Množství vyhozených potravin a ztráty během produkce a distribuce na obyvatele za rok.** Ztráty při výrobě potravin jsou v Evropě a Severní Americe asi 280–300 kg/osobu, v Subsaharské Africe jižní a jihovýchodní Asii dosahují roční ztráty 120–170 kg/osobu. Převzato z [4], upraveno.

V rozvojových zemích dosahuje roční produkce potravin asi 460 kg/obyvatele [4]. V západních zemích činí celková produkce potravin pro lidskou spotřebu 900 kg/obyvatele za rok. Obyvatelé rozvinutých částí světa se soustřeďují do oblastí s hustým osídlením. Balení potravin a jejich následný transport pomáhá vyrovnat tyto rozdíly [5]. Vývojem nových

obalových prostředků se snižuje množství znehodnocených potravin, a tedy se zvyšuje efektivita celého systému produkce potravin.

Balení potravin probíhá pomocí obalových prostředků, tento souhrnný pojem zahrnuje obalové materiály, z nich vyrobené obaly a pomocné obalové prostředky. Mezi pomocné obalové prostředky jsou řazeny lepidla, těsnící hmoty a fixační materiály. Základní materiály, které se používají pro balení potravin jsou: dřevo, kov, plast, sklo, papír, tkaniny a požitelné obaly [6].

Trh s výrobou potravinových obalů představuje nezanedbatelný ekonomický segment, který v roce 2019 dosáhl hodnoty 308 miliard amerických dolarů [7]. Z celkového množství představují plasty více než třetinu používaných materiálů při výrobě potravinových obalů [8].

### **2.1.1. Plastové obaly**

Pod pojmem plastové obaly rozumíme plasty a výrobky z nich určené ke kontaktu s potravinami [9]. Z chemického hlediska se jedná převážně o organické makromolekulární sloučeniny připravené polymerizací, polykondenzací, polyadicí nebo jiným podobným postupem z molekul s nižší molekulovou hmotností nebo chemickou přeměnou přírodních makromolekulárních látek.

Plasty jsou děleny na termoplasty, reaktoplasty a elastomery dle jejich reakce na zahřívání a viskoelastických vlastností [10]. Teplem tvrditelné reaktoplasty, jsou tvárné jen určitou dobu po zahřátí, během ochlazování dochází k zesíťování. Reaktoplasty tedy není možné opakovaně tavit. Naproti tomu termoplasty při zahřívání měknou až na taveniny, následně po ochlazení opět tvrdnou, ale nedochází k žádné chemické reakci, jedná se pouze o fyzikální proces. Tento postup je možné opakovat, což je významné pro recyklaci plastů.

Technologie potravinových obalů využívá celou řadu polymerů, jedná se převážně o termoplasty. Dalším vhodným kritériem pro dělení je chemická příbuznost. Nejběžněji používané plasty pro potravinové obaly, dělené dle chemické příbuznosti, jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1 Typy plastů používaných při výrobě obalů potravin.** Převzato z [11], upraveno.

Skupina	Název	Zkratka
Polyolefiny	Polypropylen	PP
	Nízkohustotní polyethylen	LD-PE
	Vysokohustotní polyethylen	HD-PE
	Lineární nízkohustotní polyethylen	LLD-PE
Polystyreny	Polystyren	PS
	Akrylonitrilbutadienstyren	ABS
	Styren butadien	SB
Chloroplasty	Polyvinylchlorid	PVC
	Polyvinylidenchlorid	PVDC
Fluoroplasty	Polytetrafluorethylen	PTFE
Polyestery	Polyethylentereftalát	PET
	Polykarbonát	PC
	Polyethylennaftalát	PEN
Vinylové polymery	Ethylenvinylacetát	EVA
	Polyvinylacetát	PVA
	Ethylenvinylalkohol	EVOH
Polyamidy	Polyamidy	PA

#### **2.1.1.1. Vlastnosti plastových obalů**

Plasty jsou široce využívány především díky svým výhodným vlastnostem. Mechanické vlastnosti plastů jsou podmíněny strukturou polymeru, například stupněm krystalinity [5]. Významnou mechanickou vlastností je nárůst plasticity za zvýšené teploty, díky čemuž jsou plasty tekuté, a tudíž tvarovatelné. Pro zvýšení plasticity se obecně používají změkčovadla. Díky široké škále mechanických vlastností lze z plastů vyrábět jak tvrdé a pevné obaly různých tvarů, tak měkké folie. Stěžejní charakteristikou folií je elasticita, případně smršťovatelnost.

Další klíčovou vlastností plastů je tepelná odolnost, která je důležitá především pro obaly určené ke skladování při nízkých teplotách nebo naopak pro obaly podstupující tepelnou sterilaci nebo mikrovlnný ohřev [12]. Mimořádný význam pro obalové techniky má možnost svařování folií.

V neposlední řadě plasty vykazují dobrou chemickou odolnost, nereagují ochotně s většinou organických rozpouštědel ani anorganických sloučenin jako jsou kyseliny a hydroxidy. Faktorem, který určuje možnosti využití různých plastových materiálů, jsou bariérové vlastnosti.

#### **2.1.1.2. Bariérové vlastnosti plastů**

Materiál obalu ochrání potravinu před mechanickým poškozením a nečistotami, zároveň působí jako bariéra proti uvolňování látek z potravin do vnějšího prostředí, například důležitých aromatických látek potravin [13]. Obal rovněž brání prostupování plynů, jedná se především o dusík, oxid uhličitý, kyslík a vodní páru. Současně zabraňuje pronikání kapalin nebo tuků.

Vznikne-li bariéry pro kapaliny a plyny, chrání obal zároveň potravinu i před biologickou kontaminací mikroorganismy. Přidáním změkčovačů se bariérové vlastnosti zhoršují [14, 15].

Plyny mohou prostupovat přes polymerní materiály dvěma mechanismy. Permeace je prostup plynů přes strukturu polymeru, druhou možností je průnik molekul plynu skrz defekty nebo mikropóry nacházející se mezi molekulami polymeru [16].

Kyslík pronikající do vnitřního prostoru obalu může oxidovat lipidy obsažené v potravíně, což vede ke znehodnocení potravin [1]. Také vodní pára, prostupující z okolního prostředí přes obal, může u suchých potravin zvýšit vodní aktivitu a změnit texturu potravin. I proces opačným směrem z potravin do prostředí je v některých případech nežádoucí, může docházet k vysychání, smršťování potravin, a tedy opět k jejímu znehodnocení. V některých případech je proces přestupu vodní páry naopak žádoucí. Pokud není propustnost pro vodní páru dostatečná, může dojít u potravin s vysokou vodní aktivitou, jako je ovoce a zelenina, při změně teploty ke kondenzaci vodní páry na vnitřním povrchu obalu. Takto vzniklá vlhkost je vhodná pro množení mikroorganismů, které následně mohou způsobit zkázu potravin. Z uvedených příkladů vyplývá důležitost výběru vhodného typu polymeru při balení různých potravin podle jejich nároků. Hodnoty koeficientu propustnosti pro běžné plyny a vodní páru jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tabulka 2 Koeficient propustnosti P pro kyslík, oxid uhličitý, dusík a vodní páru při standardních podmínkách, není-li uvedeno jinak [1, 17, 18].**

Typ polymeru	Koeficient propustnosti P $\frac{\text{cm}^3 \cdot \text{cm}}{\text{m}^2 \cdot 24 \text{hod} \cdot \text{atm}}$			
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	vodní pára*
LD-PE	19,7-44,0	85,4-183,9	3,9-12,5	525,6
HD-PE	3,9-7,2	11,2-29,6	0,92-2,2	85,4
PP	5,9-15,1	60,4	2,9	374,5
PVC film	0,033-0,79	0,20-6,6	0,26	1024-1806
PS	7,2-17,7	57,8-68,9	1,9-5,1	72,3-11826
PAN	0,0016	0,039	-	14,4
PA	0,079-0,25	0,26-1,05	0,066	4599
PET amorfni	0,36-0,49	1,4-2,0	0,033	-
PET 40 % krystalický	0,12-0,20	0,79-1,05	0,039	854-1202
PVDC	0,0039	0,014-0,024	0,006	9,2-29,6
EVOH 44 % ethylenu	0,0032	0,009	0,0003	-
PLA	0,72-3,7	12,4	32,7843	19,7
P3HB	0,2	0,3	-	0,1-0,5
P3HB-3HV	0,49-1,65	14,4	-	0,1-0,3
P3HB-3HHx	0,78	4,4	-	-

\*Relativní vlhkost 90 %, PAN – Polyakrylnitril, P3HB – poly(3-hydroxybutyrát), PLA – polymléčná kyselina, P3HB-3HV – Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerát)

S rostoucí tloušťkou bariéry výrazně klesá propustnost přes póry [1]. Zvětšení tloušťky stěny obalu ovšem efektivně nezabrání permeaci. Vhodným řešením je kombinace a vrstvení různých materiálů.

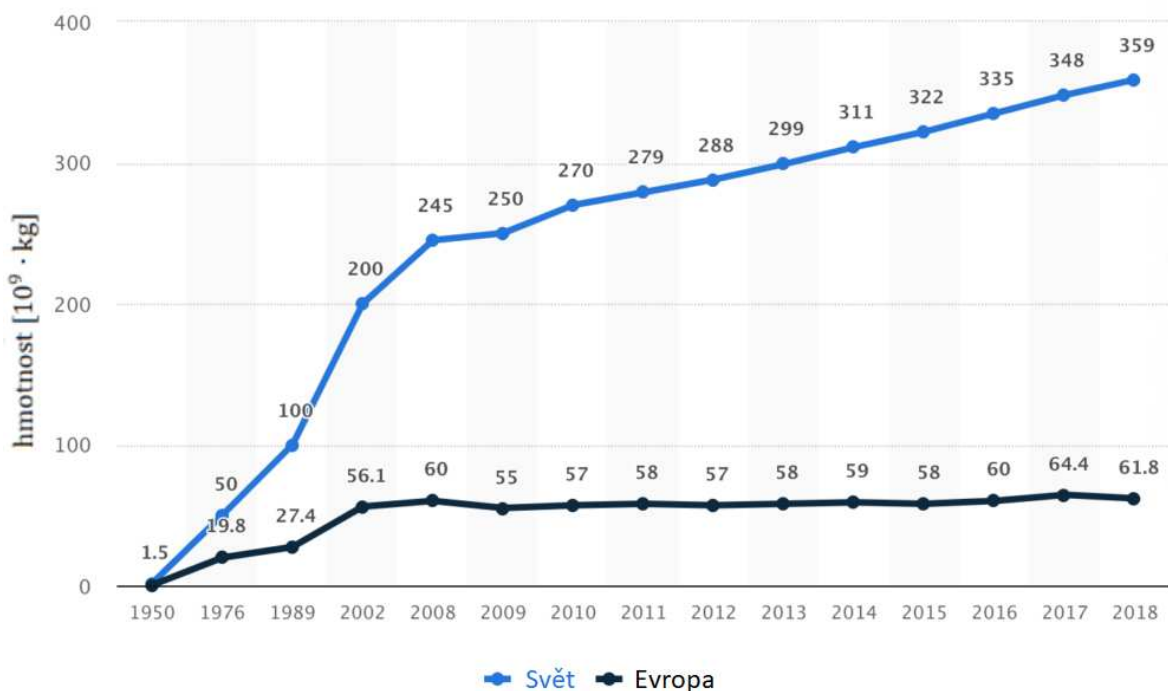
Plastové fólie mohou být kombinovány s jinými plasty koextruzí, mísením polymerů (blending), laminováním a povlékáním (coating), za účelem dosažení vlastností, které polymery nemohly poskytnout samostatně [12]. Koextruze je proces, který kombinuje vrstvy dvou nebo více plastů. Do jedné vytlačovací hlavy vstupuje tavenina z více extruderů najednou. Při laminování dochází ke spojování dvou a více vrstev plastových materiálů dohromady, dokud není dosaženo požadovaných vlastností [19]. Mohou se také přidávat různé materiály, obvykle plastové a hliníkové fólie nebo papír. Nakonec je laminát trvale spojen teplem, tlakem, svařováním nebo lepidly. Existuje několik způsobů laminace: tepelná, mokré spojování, suché spojování, laminování bez rozpouštědla nebo laminační extruze. Při procesu povlékání se nanáší částečně polymerizovaná směs taveniny na povrch potahovaného materiálu. Následně dojde k navázání polymerní směsi na substrátový materiál díky teplotní změně nebo síťováním (crosslinku).

Výše zmíněné postupy vyžadují náročné technologické postupy, a navíc finální produkt nelze snadno recyklovat [20]. Alternativním postupem k vícevrstevným technologiím je mísení polymerů (blending). Výsledkem smíchání granulátů různých polymerů není vícevrstevná struktura, ale homogenní směs. Tímto způsobem je možné zlepšit nejen bariérové vlastnosti, ale také lze přizpůsobit požadované povrchové vlastnosti jako je koeficient tření, podpora adheze, přidání barvy nebo zlepšení stability.

Aby bylo dosaženo požadovaných bariérových vlastností, musí být při kombinaci materiálů vybírány polymery podle své molekulární struktury. Polymery poskytující dobré bariérové vlastnosti pro plyny mohou mít špatné bariérové vlastnosti pro vodní páru. Příkladem jsou vysoce polární polymery obsahující hydroxylové skupiny jako jsou PA a EVOH. Naproti tomu nepolární polymery, jako je PE, mají vynikající bariérové vlastnosti pro vodní páru, ale špatné pro plyny, přičemž tato druhá vlastnost se zlepšuje se zvyšující se hustotou polyethylenu [1, 16]. Řešením může být laminování hliníkové fólie na polymerní film, případně výroba metalizované fólie, která obsahuje pouze tenkou hliníkovou vrstvu, a tudíž je levnější [21].

#### **2.1.1.3. Spotřeba plastů**

Polymerní materiály se používají od druhé poloviny 20. století. Plastové obaly usnadňují transport potravin, zacházení s nimi, snižují ztráty a v dnešní době jsou nenahraditelné. Na druhou stranu představují značný problém pro životní prostředí především mírou produkce a často také krátkou životností. Celkově bylo vyprodukováno už přes 8,3 miliard tun plastů, přičemž většinu tvořily jednorázové produkty, které se vzápětí staly nepotřebným odpadem [22]. Celosvětová produkce plastů navíc každoročně roste (Obrázek 2).



**Obrázek 2** Roční produkce plastů. Převzato z [23], upraveno.

Většina odpadu končí na skládkách nebo ve volné přírodě. Jen malá část z tohoto množství je dále energeticky zpracována ve spalovnách (asi 12 %) nebo recyklována (asi 9 %), tedy více než 6,3 miliard tun plastového odpadu zůstává v přírodě [22].

Podíl plastového odpadu, který se recykluje je velice nízký. Samotná recyklace probíhala většinou v Číně, která masově odpad dovážela [24]. Situace se ovšem změnila od roku 2018, kdy Čína přestala plastový odpad importovat [25]. Globální trh s plastovým odpadem se zaměřil na jiné rozvojové státy, kde nakládání s těmito odpady není příliš kontrolováno. Jelikož Evropa nedisponuje dostatečnými recyklačními kapacitami, došlo k nárůstu skládkování a spalování plastového odpadu. Nastalá situace a nové strategie Evropské Unie pro nakládání s plasty vytváří předpoklady k uplatnění konceptu cirkulární ekonomiky.

## 2.2. Cirkulární ekonomika

Cirkulární ekonomika a princip „Zero Waste“ představují alternativní přístupy k dnes převažující ekonomice lineární, která má negativní dopad na životní prostředí. Principem cirkulární ekonomiky je vytvořit uzavřený cyklus v průmyslové výrobě. Smyslem je zbavovat se co nejmenšího množství materiálu a většinu hmoty, kterou dnes vyhazujeme, využít jako vstupní suroviny pro další výrobní cyklus. Důsledkem čehož není nutné do systému dodávat tolik nových surovin [26]. Důraz je tedy kladen především na redukci množství, opakované používání a recyklaci materiálů. V případě plastů, přináší tento systém kromě technologických obtíží, protože úspěšně recyklovatelné jsou pouze termosety, otázku zdravotní nezávadnosti recyklovaných potravinových obalů. Recyklované polymerní obaly mohou degradovat, tudíž s vyšším stupněm recyklace se zvyšuje pravděpodobnost migrace molekul polymeru do potravin. Dále může docházet k uvolňování aditiv nebo barviv. Tímto způsobem vzniká riziko přenosu kontaminujících látek do potravin [27].

Stále rostoucí zájem veřejnosti o životní prostředí, zahrnující problematiku plastových obalů, podnítil politiky ke hledání cesty udržitelného rozvoje. Na konci roku 2015 přijala Evropská komise „Akční plán cirkulární ekonomiky 1“ zabývající se podporu principů cirkulární ekonomiky [28]. Nadále se Evropská komise tímto systémem zabývá a podporuje ho stanovením dlouhodobých cílů snížení produkce odpadu [29].

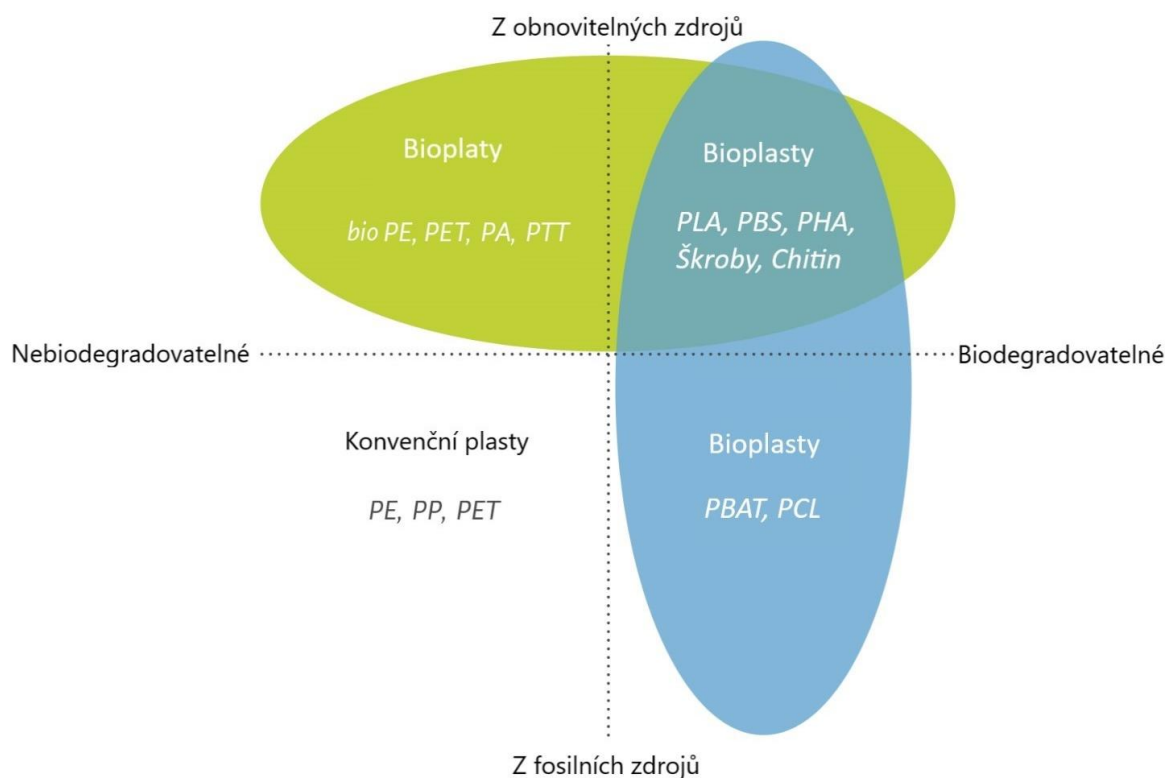
Podobný přístup k nadměrné spotřebě plastových obalů zastává koncept nakupování „bez obalu“, který spočívá v prevenci vzniku odpadu tím, že ho úplně vyloučí [30]. Je zamezeno tvorbě odpadu, ale dojde i ke ztrátě všech výhod poskytovaných balením potravin. Další nevýhodou je potřeba změnit návyky nakupování spotřebitelů. Vzdát se pohodlnosti dnešního způsobu nakupování není třeba při používání biopolymerů k balení potravin.

### **2.3. Biodegradovatelné plasty a bioplasty.**

Charakterizování pojmu biopolymer není zcela jednoznačné. Jednak můžeme biopolymery chápat ve smyslu látek syntetizovaných živými organismy, skládajících se z jednoho z typů biomakromolekul (zahrnující proteiny, nukleové kyseliny a polysacharidy), které vznikají spojením příslušných monomerů kovalentní vazbou. Tuto definici používá International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) [31].

Druhý způsob, jak můžeme na biopolymery nahlížet je jako na bioplasty, tedy jako na polymery, které jsou využívány k produkci bioplastů. Ty jsou dle IUPAC definované jako polymery získané z biomasy nebo odvozené od monomerů získaných z biomasy [31].

Samotné označení bioplast zahrnuje velkou skupinu látek s různými vlastnostmi, podle kterých jsou dále rozdělovány na základě dvou hlavních kritérií. Jedná se o biodegradabilitu a původ surového materiálu. Dle těchto znaků rozlišujeme bioplasty do tří skupin: (1) biodegradovatelné polymery tvořené obnovitelnými zdroji (získané z biologického materiálu), (2) nebiodegradovatelné biopolymery tvořené obnovitelnými zdroji a (3) biodegradovatelné polymery získané z fosilních zdrojů (Obrázek 3) [32].



**Obrázek 3 Rozdělení plastů dle biodegradability a jejich zdroje.** PE – polyethylen, PET – polyethyltereftalát, PA – polyamid, PTT – polytrimethyltereftalát, PLA – polymléčná kyselina, PBS – polybutylen sukcinát, PHA – polyhydroxyalkanoáty, PP – polypropylen, PBAT – polybutylen adipát-tereftalát, PCL – polykaprolakton. Převzato z [33], upraveno.

Dále se tato práce bude zabývat pouze skupinou biodegradovatelných biopolymerů získaných z obnovitelných zdrojů. Dle způsobu vzniku mohou být tyto biopolymery rozděleny na: (1) syntetické, chemicky připravené z obnovitelných zdrojů, například polymléčná kyselina (PLA) nebo polybutylen sukcinát (PBS), a (2) biopolymery produkované biologickými systémy jako jsou rostliny (celulóza, škrob), mikroorganismy (polyhydroxyalkanoáty) nebo živočichové (proteiny) [34]. Rozdělení nejběžnějších biopolymerů shrnuje tabulka 3.

**Tabulka 3 Rozdělení biopolymerů z obnovitelných zdrojů dle původu.** Převzato z [32], upraveno.

Rostliny	Mikroorganismy	Živočichové
Celulóza a její deriváty	PHA	Chitin
Lignin	PHF	Chitosan
Škrob a jeho deriváty	Bakteriální celulóza	Kyselina hyaluronová
Alginát	Kyselina hyaluronová	Kaseiny
Lipidy	Xantan	Syrovátkový protein
Rostlinné proteiny	Kurdlan	Kolagen
Gumy	Pullulan	Albumin
Karagenany		Keratin
PLA		Hedvábný protein

PHA – polyhydroxyalkanoáty; PHF – polyhydroxy mastné kyseliny; PLA – kyselina polymléčná.



Stejně jako v případě bioplastů je důležité přesná definice pojmu „biodegradabilní“ a s ním spojeného pojmu „kompostovatelný“ plast. Tyto pojmy definují společnosti zabývající se standardizací jako je American Society for Testing and Materials (ASTM) nebo International Organization for Standardization (ISO).

Materiály označované jako kompostovatelné plasty musí být certifikované dle ASTM D6400 nebo ISO 17088 [35]. Kompostovatelné plasty jsou dle ISO definované jako materiály, které procházejí procesem biodegradace, jehož výsledkem je pouze CO<sub>2</sub>, voda, anorganické sloučeniny a biomasa, a to v míře odpovídající jiným již zavedeným kompostovatelným materiálům. A po dokončení tohoto procesu nezůstávají žádné viditelné, rozpoznatelné ani toxické látky.

Certifikované kompostovatelné výrobky musí být likvidovány v průmyslových kompostárnách, nikoli v domácnostech [36]. Aby mohl rozklad proběhnout, respektive dostatečně rychle, vyžaduje degradace většiny těchto materiálů teplotu okolo 50–60 °C, která je dosažitelná pouze v průmyslových kompostárnách.

Biodegradovatelné plasty jsou dle ISO definované jako rozložitelné plasty, jejichž degradace vede k fragmentům s nižší molekulovou hmotností, které jsou vytvořené činností přirozeně se vyskytujících mikroorganismů, jako jsou bakterie kvasinky a řasy [35]. Z uvedených definic vyplývá, že všechny kompostovatelné materiály jsou i biodegradovatelné, ale nikoliv naopak [37].

První biodegradovatelné plastové sáčky byly vyráběny z polyethylenu ve směsi se škrobem [38]. Nelze je považovat za kompostovatelné, jelikož po rozkladu škrobu zůstaly menší polyethylenové fragmenty, které už se dále nerozkládaly. Tento materiál je tedy jen částečně biodegradabilní.

Proces rozkladu polymerů se skládá ze dvou částí. Během první dochází působením fyzikálních vlivů (teploty, vlhkosti) a působením mikroorganismů ke zkracování polymerních řetězců na kratší fragmenty polymeru [39]. Druhou fází je biologický proces, jedná se o utilizaci fragmentů polymerů mikroorganismy. Tento proces je považován za dokončený, pouze pokud jsou veškeré uhlovodíky pomocí mikroorganismů transformovány na CO<sub>2</sub>, vodu nebo biomasu. V dnešní době se věnuje pozornost plně rozložitelným polymerům. Pro praktické využití se zdají být nejslibnější tyto biopolymery: celulóza, škrob, chitin, PLA, PHA.

## **2.4. Polyhydroxyalkanoáty**

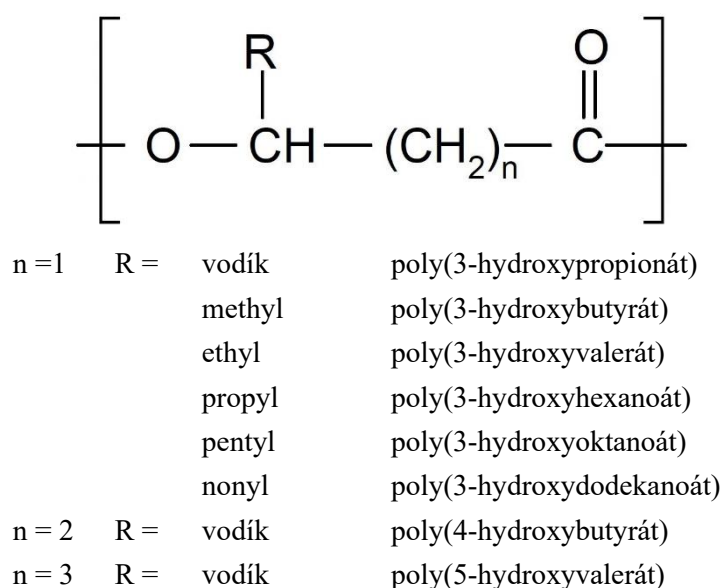
Polyhydroxyalkanoáty (PHA) mají srovnatelné fyzikální vlastnosti s polypropylenem, jsou kompostovatelné a biokompatibilní, díky tomu by se mohly stát alternativou ke konvenčním plastům. Z tohoto důvodu jsou dlouhodobě předmětem zájmu výzkumu [40]. PHA jsou produkovány celou řadou prokaryotních mikroorganismů patřících do domén bakterie a archea [41]. Mikroorganismy využívají PHA jako zásobu uhlíku a energie, kterou ukládají intracelulárně ve formě granulí. Tvorba organických nebo anorganických intracelulárních tělísek ohraničených fosfolipidovou membránou není u mikroorganismů ojedinělá. Příkladem anorganických tělísek jsou magnetosomy obsahující krystaly oxidů železa. Pokud je jádro tělísek tvořeno polyestery, jedná se o organická inkluzní tělíska, mezi které patří i PHA [42]. Granula, ve kterých jsou PHA uzavřeny jsou přibližně 0,2 až 0,5 μm velká a zdá se, že obal,

kterým jsou oddělena od cytoplazmy, je tvořen pouze proteiny namísto fosfolipidů, jak bylo předpokládáno dříve [43].

Syntéza PHA probíhá většinou za stresových podmínek charakterizovaných nadbytkem uhlíku v dostupné formě a nedostatkem dusíku nebo jiného nutrientu jako je síra, fosfor a další [44]. PHA představují vhodnou formu pro ukládání uhlíku a energie díky své hydrofobicitě a mimoto se uplatňují i při ochraně před teplotním nebo oxidačním stresem [45]. Cílenou kultivací lze dosáhnout výtěžku až 90 % hmotnosti suché hmoty [1].

PHA jsou alifatické, lineární a opticky aktivní biopolymery. Všechny obsahují ve své struktuře chirální uhlík substituovaný hydroxyskupinou v (R)-konfiguraci [44]. Jednotný charakter je zajištěn díky stereospecifitě enzymů syntetizujících PHA. Během biosyntézy polymeru dochází ke kondenzační reakci karboxylové skupiny se sousední hydroxylovou skupinou. Počet monomerních jednotek v polymeru se pohybuje v rozmezí 100–30 000, od toho se odvíjí i molekulová hmotnost, která dosahuje hodnoty  $2 \cdot 10^5$  až  $3 \cdot 10^6$  Da.

Dle počtu uhlíků, kterými je tvořena monomerní jednotka, se PHA dělí na (1) PHA s krátkým uhlíkovým řetězcem (short-chain-length, scl-PHA) obsahující 3 až 5 uhlíků, (2) PHA se středně dlouhým uhlíkovým řetězcem (medium-chain-length, mcl-PHA), které obsahují 6 až 14 atomů uhlíku a (3) PHA s dlouhým uhlíkovým řetězcem (long-chain-length, lcl-PHA), jejichž monomer se skládá z 15 a více uhlíků [46]. Obecná struktura PHA je zobrazena na obrázku 4.

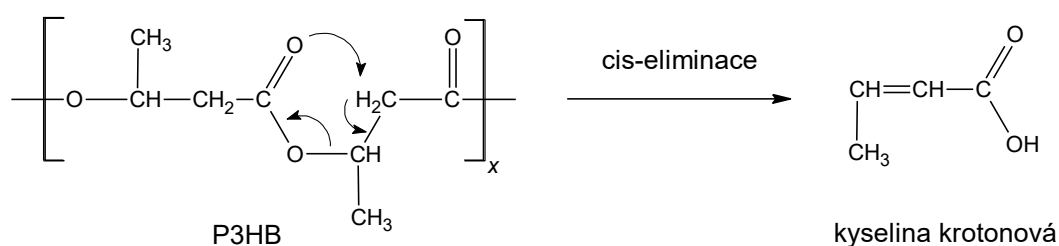


**Obrázek 4** Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů. Převzato z [40], upraveno.

V závislosti na přítomnosti různých typů monomeru se odvíjí mechanické vlastnosti materiálu, jejichž rozsah je velmi široký, od tvrdých krystalických po elastické materiály [47]. Tato různorodost je jednou z významných předností PHA. Další z výhod je potiskovatelnost, barvitelnost, tepelná odolnost, izolační vlastnosti, odolnost vůči tukům a dobré bariérové vlastnosti [48]. Nejvíce prostudovaným a nejhojněji využívaným PHA je poly(3-hydroxybutyrát).

### ***Poly(3-hydroxybutyrát)***

Poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB), je nejjednodušší a zároveň nejvíce prostudovaný zástupce skupiny PHA. Postupem času bylo zjištěno, že využití P3HB jako přímé náhrady PP v průmyslovém měřítku je velice omezené. P3HB má několik vlastností, které limitují jeho široké využití [46]. Jedná se o vysokou krystalinitu způsobující křehkosti, vysoké produkční náklady a nízkou tepelnou stabilitu v tavenině. Teplota tání ( $T_m$ ) P3HB se pohybuje okolo 180 °C, zásadní nevýhodou je, že je velmi blízká teplotě, při které dochází k tepelné degradaci. Tato tepelná nestabilita je důvodem, proč není možné P3HB běžně používat ve stávajících průmyslových zařízeních zpracovávajících konvenční plasty [49]. Za příčinu tepelné nestability je považována neradikální náhodná řetězová štěpící reakce, tzv. cis-eliminace (Obrázek 5). Produktem této degradační reakce je kyselina krotonová a její oligomery [50].



**Obrázek 5 Mechanismus cis-eliminace P3HB.** Převzato z [50], upraveno.

Proces degradace P3HB byl dále zkoumán a byl popsán jeho podrobný mechanismus. Bylo zjištěno, že degradace závisí na teplotě a době, po které je daným podmínkám polymer vystaven [51, 52]. Dále byl popsán model degradace, dle kterého na začátku probíhá náhodná autokatalytická reakce, následně dochází v koncových oblastech polymeru k autokatalytické štěpné reakci, probíhající dle kinetiky nultého řádu, vedoucí ke ztrátě molekulové hmotnosti. K dalšímu štěpení, a tedy snížení molekulové hmotnosti, může docházet, pokud je během technologického zpracování tavenina polymeru vystavena vysokému smykovému tření a vzdušné vlhkosti, například při extruzi nebo vstřikování. V důsledku poklesu molekulové hmotnosti klesá i teplota krystalizace a prodlužuje se doba krystalizace, což vede ke zvýšení lepivosti ke kovovým povrchům technologických zařízení [53]. Snížení molekulové hmotnosti způsobuje také pokles tvorby krystalizačních jader během ochlazování. Vzniká méně zato větších sférolitů, což je důvodem zhoršení mechanických vlastností, například pevnosti v tahu [49].

Dále byla popsána negativní rekrytalizace amorfni části P3HB během skladování za pokojové teploty, jelikož teplota skelného přechodu ( $T_g$ ) P3HB je blízká pokojové teplotě (Tabulka 4) [54]. Výsledkem rekrytalizace je reorganizace lamelárních krystalů vzniklých při prvotní krystalizaci taveniny, což snižuje velikost amorfni fáze mezi krystaly a zvyšuje křehkost polymeru [55]. Protože P3HB je přírodního původu, je považován za relativně čistý polymer, neobsahuje žádná rezidua katalyzátorů nebo jiné nečistoty, které běžně slouží jako krystalizační jádra. Krystalizační kinetika je pomalá, tvoří se menší množství větších sférolitů a důsledkem je zhoršení mechanických vlastností.

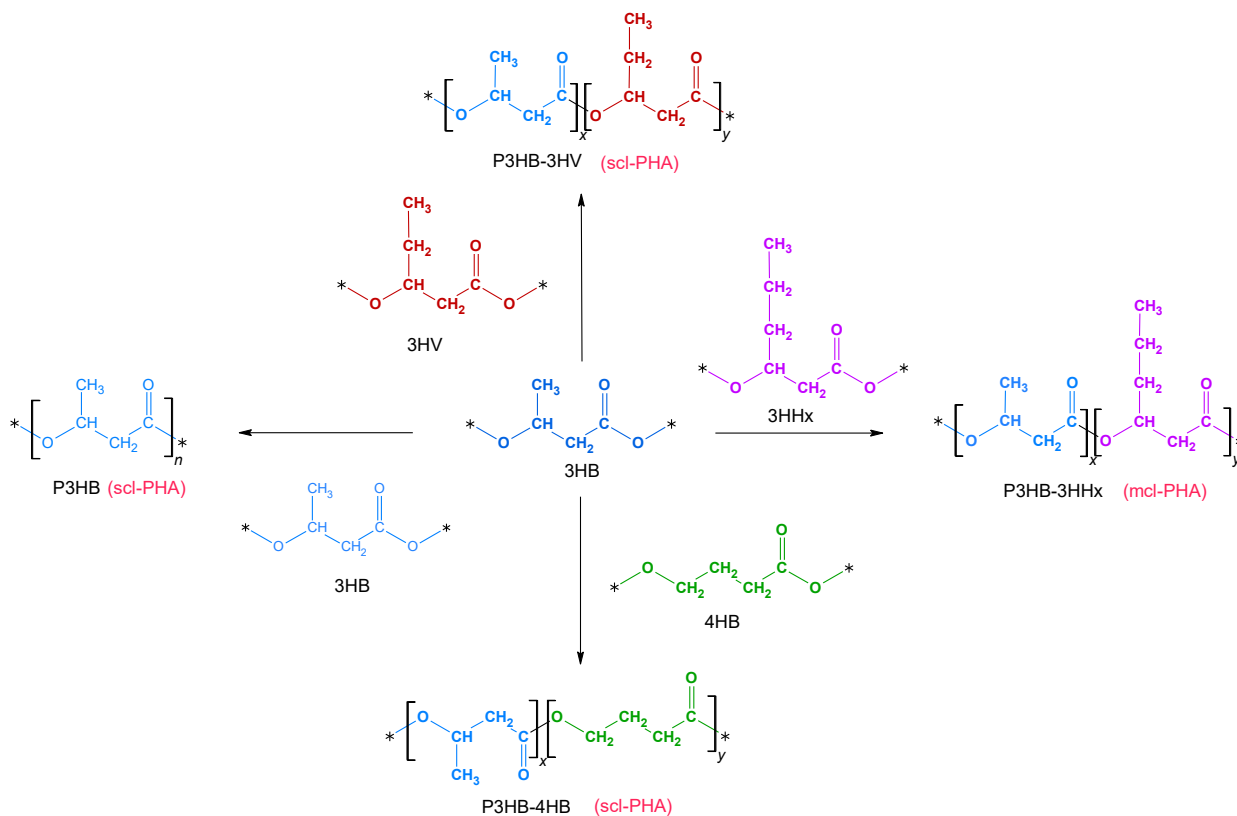
**Tabulka 4: Porovnání vlastností vybraných PHA polymerů s konvenčními plasty [17, 56–59].**

Druh polymeru	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>g</sub> [°C]	Youngův modul [GPa]	Pevnost v tahu [MPa]	Délkové prodloužení při přetržení [%]
P3HB	180	5	3,8	40	4
P4HB	53	-50	149	104	1000
P(3HB-11 % 3HV)	157	2	3,7	38	5
P(3HB-20 % 3HV)	145	-5	1,9	26	27
P(3HB-28 % 3HV)	114	-8	1,5	21	700
P(3HB-34 % 3HV)	102	-9	1,2	18	970
P(3HB-3 % 4HB)	166	-	-	28	45
P(3HB-16 % 4HB)	152	-8	-	26	444
P(3HB-64 % 4HB)	50	-35	30	17	591
P(3HB-90 % 4HB)	50	-42	100	65	1080
P(3HB-12 % 3HHx)	122	0	0,28	7	400
LD PE	130	-30	0,2	10	620
PP	176	-10	1,7	38	400

T<sub>m</sub> – teplota tání, T<sub>g</sub> – teplota skelného přechodu

Existuje několik možností, jak měnit vlastnosti P3HB a odstranit tím jeho nevýhody: (1) biosyntéza kopolymerů PHA, (2) smíchání s jinými polymery nebo změkčovadly, (3) použitím fyzikálních přístupů, přidavek nukleárních činidel, žhání (annealing), (4) chemická syntéza kopolymeru nebo chemická modifikace [60, 61].

Biosyntéza PHA kopolymerů je jedním z možných způsobů modifikace vlastností P3HB. Cílenou kultivací byly připraveny kopolyestery jako poly(3-hydroxybutyrát-*co*-hydroxyvalerát) (P3HB-3HV), poly(3-hydroxybutyrát-*co*-4-hydroxybutyrát) (P3HB-4HB) nebo poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyhexanoát) (P3HB-3HHx), s různým zastoupením monomerů (Obrázek 6). Díky odlišné struktuře, tyto polymery obsahují delší postranní řetězce, mají nižší stupeň krystalinity, lepší mechanické vlastnosti a nižší teplotu tání [49]. Tyto vlastnosti snižují riziko degradace polymeru během technologického zpracování [54]. Nevýhodou ovšem zůstává absence funkčních skupin vhodných k chemickým modifikacím [41].



**Obrázek 6** Schéma možností začlenění dalších monomerů při přípravě běžných kopolymerů PHA. scl-PHA – PHA s krátkým uhlíkovým řetězcem, mcl-PHA – PHA se středně dlouhým uhlíkovým řetězcem. Převzato z [62], upraveno.

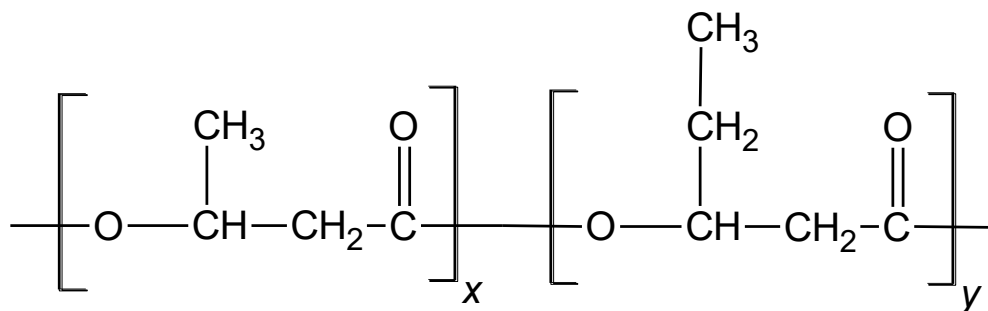
### *Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (P3HB-3HV)*

Zlepšení vlastností P3HB může být docíleno začleněním dalšího typu monomeru za vzniku kopolymeru. Přesné vlastnosti materiálu jsou značně závislé na typu, poměru zastoupení a distribuci přidaného monomeru [63]. Přítomnosti odlišných monomerů lze dosáhnout, jsou-li během biosyntézy dodány mikrobiálním producentům vhodné prekursorů, které umožňují produkci příslušných kopolymerů. Jedná se o lineární karboxylové kyseliny nebo alkoholy s lichým počtem uhlíků. Běžně jsou používány kyseliny propanová, pentanová, heptanová, propan-1-ol, pentan-1-ol nebo kyselina levulinová. Přídavek těchto substrátů ovšem zvyšuje produkční náklady. Z tohoto důvodu je vhodné směřovat potenciální uplatnění v obalovém průmyslu především do oblastí, kde může být využita přidaná hodnota tohoto pokročilého materiálu [17]. Tyto materiály mají totiž oproti konvenčním plastům lepší bariérové vlastnosti.

Nezbytnou podmínkou pro využití P3HB-3HV jako potravinového obalu, je jeho zdravotní nezávadnost. Byly provedeny testy posuzující vhodnost využití P3HB-3HV pro balení různých potravin [64]. Migrační testy potvrdily jeho bezpečnost i bariérové vlastnosti. Pouze 95% ethanol měl významný vliv na migraci látek, mimoto měl také plastifikační účinek spojený se zvýšením stupně krystalinity a poklesem molekulové hmotnosti, což bylo příčinou zvýšení propustnosti pro vodní páru.

Chemická struktura P3HB-3HV je zobrazena na obrázku 7, jedná se o statistický kopolymer s náhodným rozložením monomerních jednotek hydroxybutyrátu (3HB) a hydroxyvalerátu (3HV) [65]. Kopolymer P3HB-3HV vykazuje lepší mechanické vlastnosti než samotný

polymer P3HB (Tabulka 4). S rostoucím obsahem 3HV klesá teplota tání i teplota skelného přechodu [17]. Současně se ale zhoršují mechanické a bariérové vlastnosti [66].



**Obrázek 7 Chemická struktura P3HB-3HV**

Stupeň krystalinity P3HB-3HV mírně roste se zvyšujícím se obsahem monomeru 3HV a je vyšší než 50 % v celém rozsahu poměru monomeru 3HV (tj. od 0 % do 95 %) (Tabulka 5), jedná se tedy o látku s vysokou krystalinitou. To je důsledkem izodimorfismu P3HB-3HV. Oba monomery mají podobný tvar a velikost, proto dochází při krystalizaci k začlenění obou monomerů do jedné krystalické mřížky bez její deformace. Podle poměru zastoupení monomerů se mění typ krystalické struktury. K přechodu z P3HB do P3HV krystalické struktury dochází přibližně při 55% molární koncentraci P3HV [67]. Tato změna typu krystalické mřížky ovlivňuje rychlost krystalizace. Se zvyšujícím se molárním poměrem 3HV monomeru v P3HB-3HV (do 55 %), významně zpomaluje rychlost krystalizace ve srovnání s P3HB. Při molárním poměru 3HV vyšším než 55 % rychlost krystalizace naopak roste [68]. Pokud nejsou přítomna externí nukleační činidla, krystalizuje P3HB-3HV do velkých sférolitů.

**Tabulka 5: Stupeň krystalinity a struktura krystalů u vybraných kopolymerů P3HB [69, 70].**

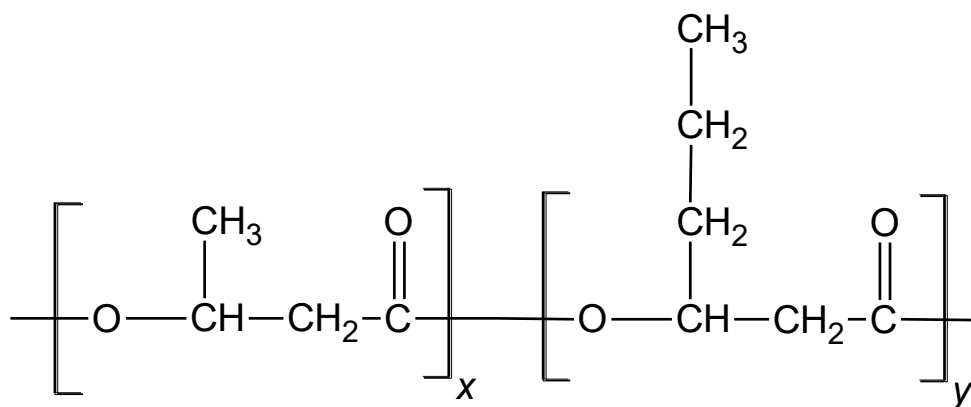
Obsah 3HV %	Krystalinita	Struktura krystalu	Obsah 4HB %	Krystalinita	Struktura krystalu	Obsah 3HHx %	Krystalinita	Struktura krystalu
0	55 ± 5	P3HB	0	55 ± 5	P3HB	5	42 ± 5	P3HB
9	58 ± 5	P3HB	10	46 ± 5	P3HB	10	34 ± 5	P3HB
21	56 ± 5	P3HB	18	45 ± 5	P3HB	15	26 ± 5	P3HB
37	52 ± 5	P3HB	29	38 ± 5	P3HB	19	22 ± 5	P3HB
53	63 ± 5	P3HV	42	23 ± 5	P3HB	25	18 ± 5	P3HB
62	57 ± 5	P3HV	49	14 ± 5	P3HB			
83	66 ± 5	P3HV						
95	70 ± 5	P3HV						

Navzdory lepším mechanickým a tepelným vlastnostem ve srovnání s P3HB se P3HB-3HV stále nejvíce jeví jako ideální materiál pro náhradu petrochemických plastů. Oproti nim má některé zásadní nevýhody, například nízkou hodnotu pevnosti v tahu, úzké teplotní rozmezí zpracování, nízkou rychlost krystalizace a vysoké produkční náklady [68]. Za účelem zlepšení vlastností P3HB-3HV a snížení jeho produkčních nákladů bylo navrženo několik postupů, jako je

vytváření směsí nebo kompozitů s biologicky rozložitelnými polymery, přírodními plnivy nebo anorganickými plnivy.

### ***Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát) (P3HB-3HHx)***

Snahy zabránit vysoké krystalinitě způsobené isodimorfismem vedly k přípravě kopolymerů P3HB s delším uhlíkovým řetězcem. Pozornost se zaměřila především na poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát) (P3HB-3HHx). Jedná se o nejběžnější polyhydroxyalkanoát ze skupiny mcl-PHA (Obrázek 8). Ve srovnání s čistým P3HB má tento kopolymer s 12% obsahem hexanoátu mnohem nižší teplotu tání (122 °C) [50]. Přítomnost propylového postranního řetězce způsobuje, že během krystalizace nedochází k začleňování hydroxyhexanových jednotek do krystalické mřížky P3HB, proto má P3HB-3HHx tak nízký stupeň krystalinity (Tabulka 5). Ovšem během skladování dochází i u tohoto polymeru k procesu sekundární krystalizace a změně vlastností polymeru. Byla otestována celá řada nukleacních činidel, kterými může být ovlivněn proces krystalizace [71]. Příkladem použitých nukleacních činidel jsou mastek, křemičitany, fenylalanin, grafit, uracil. Díky přidavku nukleacního činidla došlo ke zvýšení rychlosti krystalizace, stupně krystalinity, ale i mechanických vlastností.



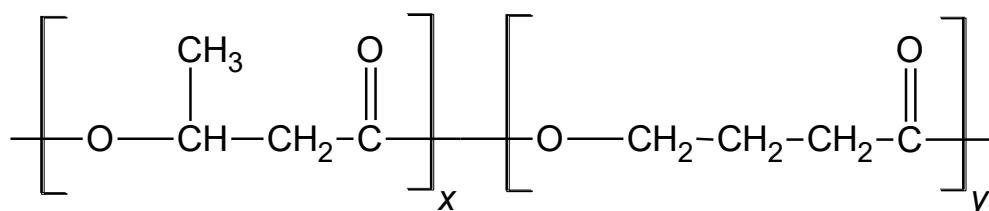
**Obrázek 8 Chemická struktura P3HB-3HHx**

Širší aplikaci P3HB-3HHx stále limituje vysoká cena výroby. Proto jsou v současné době zkoumány odpadní suroviny jako živná produkční média, například zbytky potravin nebo odpad z potravinářského průmyslu, jejichž využití by mohlo významně snížit náklady na výrobu [72]. Vzhledem k vysokým výrobním nákladům je z ekonomického hlediska vhodné využít kopolymer P3HB-3HHx na výrobky s vysokou přidanou hodnotou. V potravinářském průmyslu je vhodné využít jeho bariérové vlastnosti, které byly navíc přidáním 10 % organicky modifikovaného montmorillonitového jílu dále zlepšeny, a to až o 40 % [18].

Velmi slibné uplatnění pro P3HB-3HHx je v biomedicíně. Kopolymer byl úspěšně testován pro kultivace buněk jako jsou fibroblasty, osteoblasty, chondrocyty nebo buňky cévního endotelu [73]. Při výzkumu byla popsána nízká míra biodegradovatelnosti, což představuje problém potenciální aplikace. Ta byla zlepšena použitím UV-záření, které významně snížilo molekulovou hmotnost polymeru (z 525 kDa na 70–7 kDa v závislosti na době expozice). Mechanické vlastnosti polymeru, které se odvíjí od molekulové hmotnosti byly zhoršeny pouze mírně.

### ***Poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) (P3HB-4HB)***

Dalším zástupcem kopolymerů ze skupiny PHA je poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) (P3HB-4HB). Jedná se o kopolymer s náhodným rozložením monomerních jednotek. Chemická struktura P3HB-4HB je zobrazena na obrázku 9. Biosyntéza může probíhat díky přidání prekurzorů do kultivačního média, úspěšně byly použity  $\gamma$ -butyrolakton, kyselina 4-hydroxybutylová a  $\omega$ -alkandiol [74]. Vlastnosti tohoto kopolymeru v krystalickém stavu se však značně liší od vlastností P3HB nebo P3HB-3HV [65, 75]. Stupeň krystalinity P3HB-4HB závisí na množství 3HB monomeru a jeho snížená koncentrace způsobuje pokles krystalinity kopolymeru (Tabulka 5). Kvůli odlišné struktuře nemohou být 4HB monomery začleněny do krystalové mřížky typu 3HB, což zabraňuje kokrystalizaci. Podle obsahu 4HB monomeru, lze připravit materiály s velmi různorodými vlastnostmi od tvrdých krystalických po velmi pružné [76]. Kopolymer P3HB-4HB mají ve srovnání s čistým P3HB nižší teplotu tání, která při obsahu přibližně 65 % 4HB monomeru klesá až k 50 °C [74]. Obdobně se dle obsahu monomeru 4HB mění mechanické vlastnosti, s jeho rostoucím obsahem se zvyšuje délkové prodloužení (až na 1080 %), Youngův modul (až 100 GPa) i pevnost v tahu (až 65 MPa) [77]. Za pokojové teploty se P3HB-4HB chová jako elastomer.



**Obrázek 9 Chemická struktura P(3HB-4HB)**

P(3HB-4HB) má potenciál pro uplatnění v medicínských aplikacích. Tento kopolymer vykazuje v porovnání s ostatními PHA větší míru degradace *in vivo*, kterou je možné ovlivnit obsahem 4HB monomeru [78]. Testy *in vitro* kultivace fibroblastů ukázaly, že z hlediska rychlosti růstu, jsou P(3HB-4HB) lepším povrchem než homopolymer P3HB, což naznačuje lepší biokompatibilitu tohoto materiálu [75].

#### **2.4.1. Plastifikátory**

Přídavek změkčovadel je považován za jednoduchý způsob modifikace P3HB. Plastifikátory jsou nízkomolekulární látky, které reagují s amorfni fází polymerů a zabraňují její sekundární krystalizaci [79]. Mnohé ze zkoumaných látek dokázaly snížit teplotu skelného přechodu, velikost krystalů nebo stupeň krystalinity. Pokles stupně krystalinity společně s přítomností flexibilních řetězců vedl ke snížení teploty tání. Při zpracování tímto způsobem modifikovaných polymerů je možné použít nižší teplotu, a tudíž k tepelné degradaci polymeru dochází v menší míře. Plastifikátory také ovlivňují mechanické vlastnosti, obecně výrazně zvyšují délkové prodloužení, ale naopak snižují pevnost v tahu [80].

Změkčovadla bývají přidávána společně s látkami podporujícími krystalizaci (nukleačními činidly), během krystalizace tedy vzniká větší počet menších krystalů [54]. Byla zkoumána celá řada plastifikátorů, jako glycerol [81], glycerol triacetát [82], glycerol poly(oxypropylen)triol [83], acetyl tributyl citrát [84], estery kyseliny salicylové [85], sójový olej [86], polyethylen



glykol [87], nízkomolekulární P3HB [79]. Bylo zjištěno, že některá změkčovadla migrují k povrchu polymeru. Nejsou-li chemicky spojeny s polymerní matricí dochází v průběhu času ke snížení jejich účinku. Ne všechny zkoumané stabilizátory se osvědčily, testování sloučenin hliníku, křemíku a dalších anorganických látek odhalilo jejich negativní efekt, jelikož podporovaly degradaci polymeru [61]. Stejným způsobem působí i různé nečistoty kontaminující P3HB.

#### 2.4.2. Mísení polymerů v tavenině

Další efektivní metoda používaná pro zlepšení vlastností polymerů je fyzikální mísení polymerů v tavenině „blending“. Materiály, které jsou za tímto účelem používány dělíme podle velikosti na polymery nebo nanočástice [62]. Přídavkem anorganických nanočástic dochází ke zvýšení hustoty krystalizačních jader a vzniklé krystaly jsou tak menší. Jako plniva pro PHA byly zkoumány například nanotrubičky z disulfidu wolframu [88] aplikované k P3HB, dále mastek, hydroxyapatit, nitrid boritý a stearat zinečnatý s P3HB-4HB [89] nebo uhlíkové nanotrubičky s P3HB-3HV [90]. Přidáním zmíněných sloučenin došlo ke snížení aktivační energie pro krystalizaci, zvýšení rychlosti a teploty, při které polymery krystalizovaly. Aditiva také mohou zlepšit tepelnou odolnost polymerů. Oxid titaničitý zvýšil teplotu degradace P3HB-3HV až na 265 °C [91]. Při použití grafenu jako nukleačního činidla došlo ke zvýšení tepelné degradace u P3HB-3HV na 292 °C [92] a u organicky modifikovaného montmorillonitového jílu dokonce na 300 °C [93]. Plniva mohou ovlivňovat i mechanické vlastnosti, montmorillonitový jíl způsobil zvýšení Youngova modulu a to až 2,5krát, zároveň ale elasticita klesla přibližně stejným poměrem.

Kromě anorganické sloučeniny jsou zkoumány i možnosti využití biologických materiálů jako plniva, především celulózy [66]. Přítomnost celulózových nanovláken usnadnila krystalizaci P3HB-3HV, což vedlo ke snížení teploty krystalizace. U nanokompozitů také vzrostla teplota skelného přechodu v důsledku omezené mobility polymerních řetězců. Aplikace nízkých koncentrací nanovláken vedla ke zlepšení tepelné stability v důsledku vytvoření silné sítě vodíkových vazeb mezi polymerní matricí a nanovláknami. Na druhou stranu celulózová nanovláknina měla jen mírný vliv na bariérové vlastnosti a mechanické vlastnosti nebyly ovlivněny vůbec.

Nanokrystaly jsou vedle nanovláken další formou celulózových plniv, které byly přimíchány k PHA [94]. Celulózové nanokrystaly (CNC) mají vysokou specifickou plochu povrchu a jejich začleněním se zvýšila rychlost nukleace a rychlost krystalizace nanokompozitů. Současně bylo dosaženo zlepšení tepelné stability a mechanických vlastností. Ve srovnání s P3HB-3HV došlo u nanokompozitů obsahujících 10 % CNC ke zlepšení pevnosti v tahu o 150 % a ke zvýšení Youngova modulu o 250 %.

Po celulóze je druhým nejrozšířenějším biopolymerem vyskytujícím se na Zemi chitin [95]. Stejně jako u celulózy byl zkoumán jeho efekt na PHA, Chitin byl přidán k P3HB-3HV ve formě nanokrystalů a acetylovaných nanokrystalů [96]. Z výsledků vyplývá, že došlo ke snížení stupně krystalinity a zlepšení mechanických vlastností, přičemž acetylované chitinové nanokrystaly dosáhly většího zlepšení než neacetylované. Acetylace chitinu snížila jeho hydrofilitu nahrazením některých hydroxylových skupin acetylovými. Dále došlo ke snížení

intermolekulárních vodíkových vazeb mezi P3HB-3HV matricí a chitinovými nanokrystaly, což pravděpodobně vedlo k lepšímu promísení nanokrystalů s polymerem.

Do skupiny obnovitelných přírodních zdrojů, které se používají jako plniva pro polymery patří také lignin [97]. Hydroxylové skupiny ve struktuře ligninu jsou příčinou polárního charakteru ligninu a ovlivňují mísitelnost s dalšími sloučeninami. Rozdílná polarita ligninu a PHA způsobuje při mísení komplikace. Kompatibilita ligninu s PHA souvisí s interakcemi vodíkových vazeb mezi karboxylovými skupinami PHA a hydroxylovými skupinami ligninu [98]. Pokud nedojde k interakcím mezi polymery, vznikají oddělené fáze a výsledný efekt plniva je negativní. Mezifázová adheze je rozhodujícím faktorem při zlepšování vlastností těchto směsí, principem je schopnost přenášet napětí na rozhraní fází z jedné fáze do druhé [99,100]. Problematické je dále nepravidelné rozložení hydroxylových skupin v heteropolymeru ligninu. V důsledku silných inter- a intra-molekulárních vodíkových vazeb mezi kyslíkem přítomným v etherových vazbách a hydroxylovými nebo karbonylovými skupinami může docházet k bodové koncentraci ligninu ve směsi [101].

Studie zabývající se aplikací ligninu jako plniva mají rozporuplné výsledky. Úspěšnost aplikace ligninu k PHA pravděpodobně záleží na původu a způsobu izolace konkrétního ligninu, čímž jsou ovlivněny jeho vlastnosti. Některé ligniny jsou nemísitelné s PHA a jako plniva se neosvědčily, například zkoumaný lignin z bagasy [102] nebo komerční soda lignin [103]. V jiných studiích se podařilo dosáhnout pozitivního účinku plniva, přídavek ligninu k PHA zlepšil tepelnou stabilitu připraveného kompozitu [104], působil jako nukleační činidlo [105] nebo v případě ligninu izolovaného enzymatickou hydrolýzou štěpky z borovice montereyské zlepšoval možnosti při 3D tisku [106]. Kompatibilita mezi ligninem a PHA může být zvýšena různými postupy, jako je derivatizace hydroxylových skupin ligninu esterifikací [101], zesítnění nebo roubování [99], které budou podrobněji diskutovány v dalších kapitolách.

Za účelem zlepšení vlastností je možné polyhydroxyalkanoáty míchat s jinými polymery, a to jak biodegradovatelnými tak nebiodegradovatelnými. Ze skupiny nebiodegradovatelných polymerů byly studovány směsi krystalického P3HB nebo P3HB-3HV s amorfními polymery jako polystyren [107], termoplastický polyuretan [108], polymethylmethakrylát [109] nebo polyvinylacetát [110]. Jelikož jedna z klíčových vlastností PHA je kompostovatelnost, mají větší potenciál studie zabývající se směsmi PHA s jinými rozložitelnými polymery. Zástupci chemicky připravených biopolymerů jsou kyselina polymléčná a polykaprolakton.

### ***Kyselina polymléčná (PLA)***

Přírozně se vyskytující monomer PLA je kyselina mléčná, vyrábí se buď chemickou syntézou z laktonitrilu nebo častěji fermentací polysacharidů [111]. Z monomeru se PLA připravuje procesem chemické polymerace. PLA je lineární alifatický termoplast s polyesterovou strukturou, který se používá jako obalový materiál nezatěžující životní prostředí a jako biokompatibilní materiál v medicíně [46]. Pro tvorbu směsí z PHA a PLA je zásadní jejich obtížná vzájemná mísitelnost. Bylo zjištěno, že mísitelnost P3HB a PLA závisí na molekulové hmotnosti přimíchávaného polymeru [112]. P3HB je mísitelný v tavenině s PLA, pokud má PLA nízkou molekulární hmotnost ( $M_w < 18\,000$ ) v celém rozsahu složení, pokud je ale použita PLA s vysokou molekulovou hmotností ( $M_w > 18\,000$ ) vykazuje směs dvofázovou

separaci. Obdobně je PLA mísitelná s P3HB s molekulovou hmotností do  $M_w = 9400$  s obsahem P3HB do 50 hmotnostních procent a analogicky je PLA nemísitelná s P3HB s vysokou molekulovou hmotností. Vlastnosti směsí PLA/P3HB závisí na složení, chemickém nebo fyzikálním zesílení a podmínkách zpracování.

Krystalizační chování směsi bylo ovlivněno množstvím přidané PLA. Obecně došlo ke snížení krystalinity i teploty tání směsi v závislosti na rostoucím obsahu PLA [113]. Taktéž mechanické vlastnosti byly ovlivněny podle poměru polymerů, hodnoty Youngova modulu se snižovaly s rostoucím přídatkem PLA, naopak délkové prodloužení a pevnost v tahu se s nárůstem obsahu PLA zlepšovaly [114].

Ze skupiny PHA bylo zkoumáno mísení i dalších zástupců s PLA. Bylo zjištěno, že smícháním P3HB-3HHx s PLA bylo u výsledného materiálu dosaženo vyšší teploty krystalizace a materiál vykazoval lepší mísitelnost v porovnání se zcela nemísitelnou směsí vysokomolekulárních P3HB a PLA [115]. U směsi P3HB-4HB s PLA s rostoucím obsahem PLA rostla i pevnost v tahu, současně se ale snižovalo délkové prodloužení při přetržení. Teplota skelného přechodu nebyla přidáním PLA ovlivněna, což ukazuje na nemísitelnou povahu P3HB-4HB a PLA [116].

### ***Polykaprolakton (PCL)***

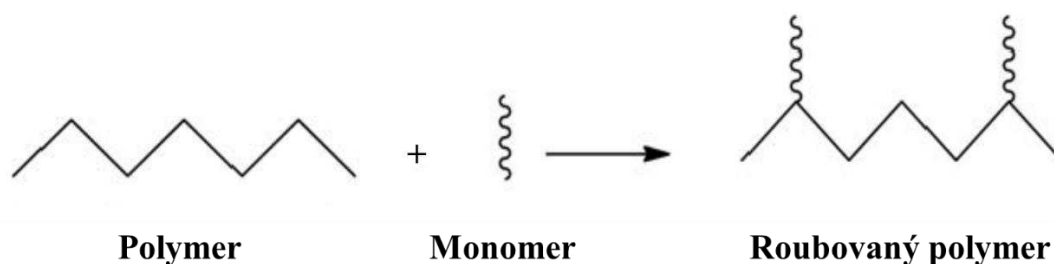
PCL je další polymerní materiál vhodný k mísení s PHA. Jedná se o biokompatibilní, biologicky vstřebatelný, kompostovatelný, semikrystalický, alifatický polyester s dobrými mechanickými vlastnostmi a delší dobou degradace [117]. Díky těmto vlastnostem je PCL vhodným a široce zkoumaným materiálem pro použití v tkáňovém inženýrství. Kombinace PCL s PHA vedla ke slibným výsledkům. Dle provedených studií se osvědčily elektrospiningem připravené skafoldy ze směsi P3HB-3HV s PCL, a to jak ze strany mechanických vlastností, tak podpory růstu buněk [118]. Přídavek PCL k P3HB-3HHx zlepšil mechanické vlastnosti získané směsí, především houževnatost, na úroveň srovnatelnou se spongiózní lidskou kostí. Za využití proliferačního testu byla dále na modelu humánních fetálních mezenchymálních kmenových buněk potvrzena biokompatibilita připravené směsi [119].

### **2.4.3. Chemické modifikace**

Struktury běžných PHA neobsahují žádné funkční skupiny využitelné k chemickým reakcím. Přesto lze PHA pomocí chemických modifikací cíleně upravovat, odstraňovat jejich nevýhody a připravovat nové funkční materiály na bázi PHA s různou strukturou i vlastnostmi pro specifické aplikace [46].

### ***Roubování***

Začleněním dalších složek do řetězců PHA metodou roubování lze účinně ovlivňovat kompatibilitu a krystalizační chování PHA [10]. Během roubování dochází ke vzniku kovalentních i nekovalentních vazeb mezi oběma složkami. Obrázek 10 popisuje obecný mechanismus roubování. Kopolymer se obecně skládá ze dvou různých druhů monomerních jednotek, v případě roubovaných kopolymerů je k hlavnímu řetězci připojen jeden nebo více postranních řetězců.



**Obrázek 10** Obecný mechanismus roubování. Převzato z [41], upraveno.

Roubování je tradičním a dobře prostudovaným způsobem modifikace celulózy [120]. Nicméně přítomnost velkého počtu hydroxylových skupin způsobuje polární charakter celulóзовých vláken, proto je obtížné rovnoměrně rozptýlit polární celulózu v nepolární polymerní matici [121]. Tento problém může vést ke špatnému propojení mezi celulózou a polymerní maticí a celulózová vlákna mají v matici funkci pouze jednoduchého plniva namísto kovalentně vázané složky.

Metodou reaktivního vytlačování bylo úspěšně dosaženo roubování mezi P3HB a celulóзовými vlákny [122]. Recentní studie se zabývají mechanismem reakce roubování polymeru P3HB na celulózová vlákna pomocí použití malého množství peroxidu. Peroxid byl během extruze vystaven teplu, rozložil se na volné radikály, které iniciovaly roubování mezi řetězcí PHA a celulózy. Výsledný kopolymer si udržel tuhost celulózy a flexibilitu PHA, navíc během tohoto postupu nebylo nutné použití toxických rozpouštědel. Bylo zjištěno, že metodou roubování došlo ke zlepšení houževnatosti, elasticity, tepelné stability a snížení krystalinity v porovnání s jednoduchými směsmi P3HB/celulóza i P3HB-3HV/celulóza [121].

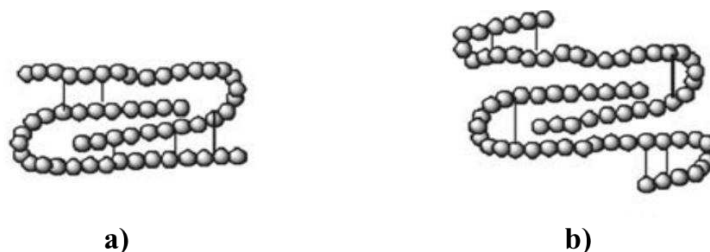
Taktéž chitin byl metodou chlorace úspěšně roubován s P3HB-3HV [123], dále chitosan, deacetylovaný derivát chitinu, byl roubován s P3HB pomocí gama záření [124]. Zatímco využitím chitinu došlo ke snížení stupně krystalinity i krystalizační teploty (o 22 °C), v případě chitosanu nebylo dosaženo jednoznačných výsledků.

Roubování PHA s ligninem je možné provést pomocí peroxidu obdobným způsobem jako u celulózy. Roubováním kraft ligninu na P3HB-3HV přídavkem dikumylperoxidu bylo dosaženo snížení stupně krystality kopolymeru, zatímco teplota krystalizace byla zvýšena, dále došlo k výraznému snížení velikosti krystalů a jejich zvýšené hustotě. [99]. Roubování také zlepšilo tepelnou stabilitu a mechanické vlastnosti P3HB-3HV. Zlepšení mechanických vlastností bylo dosaženo i ve studii, zabývající se přípravou roubovaného kopolymeru kraft ligninu s P3HB metodou elektrospinningu, ve které byl využit jako polymerační činidlo  $\beta$ -butyrolakton. Připravený materiál prokázal biokompatibilitu a měl také antioxidační vlastnosti [100].

Pro modifikaci PHA metodou roubování lze využít i konvenční polymery jako polyethylenglykol, 2-hydroxyethylmethakrylát nebo poly(methylmethakrylát) (PMMA) [125]. Roubované kopolymery P3HB a PMMA vykazují zlepšené mechanické vlastnosti a zlepšenou biokompatibilitu ve srovnání se směsí PMMA/P3HB [109].

## Zesíťování

Zesíťování je reakce při níž dochází k propojení polymerních řetězců pomocí kovalentních vazeb. Ve většině případů je zesíťování nevratný proces. Obecně zesíťování polymerů způsobuje zvýšení pevnosti materiálu. Pokud dojde ke vzniku vazeb mezi dvěma řetězci polymeru jde o intermolekulární zesíťování, v případě vzniku vazeb mezi jedním řetězcem se jedná o intramolekulární reakci (Obrázek 11) [126].



**Obrázek 11** Zobrazení intermolekulárních a) a intramolekulárních b) vazeb při zesíťování. Převzato z [126], upraveno.

Metodou reaktivní extruze pomocí volných radikálů lze regulovat zesíťování řetězců. Dikumylperoxid (DCP) je účinným zesíťovacím činidlem pro P3HB-3HV [127]. Při použití malého množství DCP (do 1 %), byla zvýšena viskozita taveniny polymeru P3HB-3HV, došlo ke zlepšení mechanických vlastností, poklesu stupně krystalinity i teploty tání. Naopak použití vyššího množství činidla pro zesíťování mělo na polymer negativní vliv. Bylo zjištěno, že k radikálovým reakcím dochází na terciárních atomech uhlíku v řetězci P3HB-3HV [128]. Obdobným způsobem se jako zesíťovací činidlo osvědčilo použití terc-butylperoxybenzoátu respektive jeho směs s triallylkyanurátem [49].

## 2.5. Odpad z vinařského průmyslu

Vinná réva patří mezi pět nejvíce pěstovaných druhů ovoce na světě. Celosvětová roční produkce dosáhla v roce 2018 hodnoty 77,8 milionů tun sklizených hroznů [129]. V České republice se vinná réva pěstuje na 18 tisících hektarech a sklizeň hroznů činila v roce 2018 103,7 tisíc tun [130]. Během celého procesu výroby vína vzniká řada odpadních produktů. Jedná se o sedimentační kaly, matoliny (hroznové výlisky) a třapiny (stonky). Vinné kaly a výlisky mohou mít díky vysokému obsahu polyfenolických látek fyto toxické účinky, proto musí být odborně zlikvidovány [131]. Náklady na likvidaci těchto odpadů jsou vysoké, proto jsou výrobci motivováni hledat alternativní způsoby jejich využití, které jsou založeny na zisku hodnotných látek obsažených v těchto odpadech.

Hroznové výlisky se skládají ze slupek, úlomků třapin, semen a zbytků dřeně. Z chemického hlediska jsou zastoupeny ve velké míře organické kyseliny, polyfenoly, lignocelulóza a u bílých hroznových výlísků zbytkové cukry, zatímco červené výlisky obsahují kromě zbytkových cukrů i ethanol, což je dáno rozdílným způsobem výroby vína [132]. V současnosti využívaná řešení jsou kompostování, příměs do krmiv pro hospodářská zvířata, energetické využití ve formě biomasy jako biopalivo 2. generace [133] nebo surovina pro výrobu matolinové pálenky neboli matolinovice [134]. Jedná se o destilát, který se vyrábí ze zkvašených vinných matolin.

Existuje celá řada studií zabývajících se sofistikovanějším zpracováním těchto odpadů. Zbytkový cukr může být snadno fermentován na ethanol, který následně lze použít jako surovinu pro další zpracování nebo jako biopalivo [135]. Většina cenných sloučenin odchází s hroznovou šťávou při lisování, ovšem i ve výliscích jich zůstává nezanedbatelné množství, které je možné extrahovat. Chemické složení hroznových výlisků je uvedeno v tabulce 6.

**Tabulka 6 Chemické složení hroznových výlisků v g·kg<sup>-1</sup> pokud není uvedeno jinak [136, 137].**

Organická hmota (%)	Celkový C	Celkový N	Poměr C:N	Celkový P	Celkový K
91 ± 0,30	484 ± 1,60	20 ± 0,62	24 ± 0,72	4 ± 0,08	31 ± 0,56

pH	Lignin	Celulóza	Hemicelulóza	Celkové polyfenoly GAE	Celkové antokyany
4,4 ± 0,04	516 ± 9,56	225 ± 10,39	101 ± 1,39	205 ± 9,43	1,25 ± 0,04

Hodnota obsahu fenolických látek bývá vztažena na ekvivalent fenolové kyseliny, nejčastěji kyseliny galové GAE, neboli gallic acid equivalents (ekvivalent kyseliny galové).

### 2.5.1. Extrahovatelné látky

Extrakty z hroznových výlisků mohou být využity ve farmaceutickém, kosmetickém nebo potravinářském průmyslu [138]. Hrozny, respektive jejich výlisky jsou bohaté na fenolické látky. Jedná se o rostlinné sekundární metabolity, které mají antioxidační vlastnosti a jsou zodpovědné za senzorické vlastnosti vína [139]. Důležité skupiny představují (1) fenolické kyseliny, (2) flavonoidy, (3) lignany, (4) taniny a (5) stilbeny [140].

Trpká chuť vína je spojena s přítomností tříslovin neboli tanninů. Tanniny v ústní dutině denaturují proteiny slin, které mají ochrannou funkci, v důsledku čehož mohou interagovat s receptorovými proteiny [141]. Tanniny dělíme na hydrolyzované (deriváty kyseliny galové) a kondenzované, které se nazývají proanthokyanidiny.

Pravidelná konzumace potravin bohatých na anthokyany a proanthokyanidiny má díky jejich antioxidačnímu účinku blahodárny vliv na lidský organismus [142]. Červené odrůdy jsou na anthokyany bohaté, zatímco bílé odrůdy jsou na jejich obsah chudé. Anthokyany jsou skupina rostlinných barviv a řadí se mezi flavonoidy, což je největší a nejvíce zkoumaná skupina fenolických látek [140]. Anthokyany mají velkou antioxidační kapacitu, která je dle modelových studií *in vitro* i *in vivo* srovnatelná s vitamínem E [143]. Obsah anthokyanů v čerstvých hroznech dosahuje 0,3–7,5 g·kg<sup>-1</sup> [141]. Blahodárny účinek na lidský organismus je spojený s kardioprotekcí, neuroprotekcí, antidiabetickými vlastnostmi, depigmentací, působí protizánětlivě a preventivně proti národovým onemocněním [143].

Stilbeny mají podobné biologické účinky jako zmíněné anthokyany. Tyto účinky jsou považovány za zprostředkované několika univerzálními signálními drahami [144]. Resveratrol je nejčastěji studovaným zástupcem stilbenů. Resveratrol snižoval markery oxidačního stresu a zánětu u různých modelů. Pozitivní účinek má především na kardiovaskulární systém, mimo to zlepšil resveratrol inzulínovou rezistenci a glukózovou toleranci na zvířecích

modelech diabetu [145]. V jiných studiích vyvolal apoptózu a inhiboval proliferaci různých rakovinných buněčných linií nebo inhiboval melanogenezi.

Obsah fenolických látek je významně ovlivněn různými faktory. Vliv má především odrůda révy, kvalita dané sklizně, místo pěstování, způsob extrakce a další. Hodnota obsahu fenolických látek bývá vztažena na ekvivalent fenolové kyseliny, nejčastěji kyseliny galové (GAE), neboli gallic acid equivalents (ekvivalent kyseliny galové). Celkový obsah fenolických látek může dosahovat až 204 mg GAE·g<sup>-1</sup> [137, 146].

Proces extrakce aktivních látek z matolin je klíčový krok při zhodnocování vinařských odpadů. Tradiční způsob extrakce kapalina-pevná látka (SLE, solid-liquide extraction) má řadu nevýhod, například spotřebu organických rozpouštědel, časovou náročnost, použití vysoké teploty. Z tohoto důvodu je snaha používat nové techniky, jako je extrakce podporovaná ultrazvukem, mikrovlnným ohřevem, zrychlená extrakce rozpouštědlem, pomocí vysokonapětového elektrického výboje, pulzního elektrického pole, infračervená extrakce, superkritická fluidní extrakce [137]. Zmíněné metody dosahují násobně lepší výtěžky než klasická SLE.

Extrakt aktivních látek z matolin byl intenzivně zkoumán a použit v různých studiích zabývajících se potravinářskými technologiemi. Například použití extraktu jako aditiva při pečení chleba za účelem zvýšení antioxidační aktivity, potvrdilo předpokládaný efekt v závislosti na dávce extraktu [147]. Mimoto přídavek extraktu vykázal inhibiční aktivitu proti tvorbě karboxymethyl-lysinu, který se nachází v chlebové kůrce a je považován za biomarker stárnutí a oxidativního stresu. Dále byl zkoumán přídavek hroznových výlisků do krmiva brojlerů [148]. Obohacené krmivo sice nemělo žádný vliv na přírůstek hmotnosti brojlerů, ovšem mělo pozitivní vliv na oxidaci lipidů v kuřecím mase během skladování. Přidání extraktů z hroznových výlisků do krmiv zvířat vykazuje různé účinky a tato problematika je přehledně zpracována v literatuře [149].

Aplikace extraktu z hroznových výlisků bránila oxidaci lipidů a proteinů v hovězím mase. Během pokusu byla navíc zachována červená barva masa [150]. Ke shodným závěrům bylo dospěno i u zkoumání účinků extraktu na vepřové maso [151] nebo ryby [152]. Kromě masného průmyslu byla zkoumána aplikace extraktu i v mlékárenském průmyslu. Úspěšně byl extrakt přidán při výrobě sýru, přičemž byla sledována degradace účinných látek způsobená technologickým zpracováním a jejich antioxidační aktivita [153]. Obě analyzovaná kritéria vykazala pozitivní závěry. Dále byly hroznové výlisky přidány do jogurtů a salátových dresinků [154]. Podařilo se vyrobit funkční potraviny s antioxidační aktivitou obohacené o zdroj vlákniny. Zvýšila se jejich nutriční hodnota a prodloužila doba trvanlivosti.

Bylo zjištěno, že extrakt z hroznových výlisků mírní tvorbu akrylamidu, v modelu simulujícím smažené bramborové lupínky došlo k poklesu akrylamidu o 60 % [155]. Akrylamid vzniká jako vedlejší produkt Mailardovy reakce, jedná se o neurotoxickou a potencionálně karcinogenní sloučeninu [141]. Aktivní látky získané extrakcí se podařilo úspěšně enkapsulovat metodou sprejového sušení. Produkt si udržel antioxidační kapacitu během skladování a mohl by nahradit syntetické antioxidanty [156].

### 2.5.2. Další způsoby zpracování

Kromě extrakce aktivních látek lze zpracovávat matoliny i jinými způsoby. Hroznové výlisky jsou bohaté na lignocelulózové sloučeniny, které lze hydrolyzovat za zisku cukerných roztoků, které mohou být využity jako uhlíkový zdroj pro mikroorganismy při produkci biopolymerů [157]. Bylo navržen postup zpracování hroznových výlisků při výrobě bioethanolu pomocí fermentace přímo v pevném stavu [158]. Své využití našla i hroznová semena, jsou bohatá na mastné kyseliny, proto z nich lze získat hroznový olej extrakcí nebo lisováním [159]. Další sloučeninou s potenciálem širokého uplatnění, kterou je možné izolovat z matolin je lignin. [133].

## 2.6. Lignin

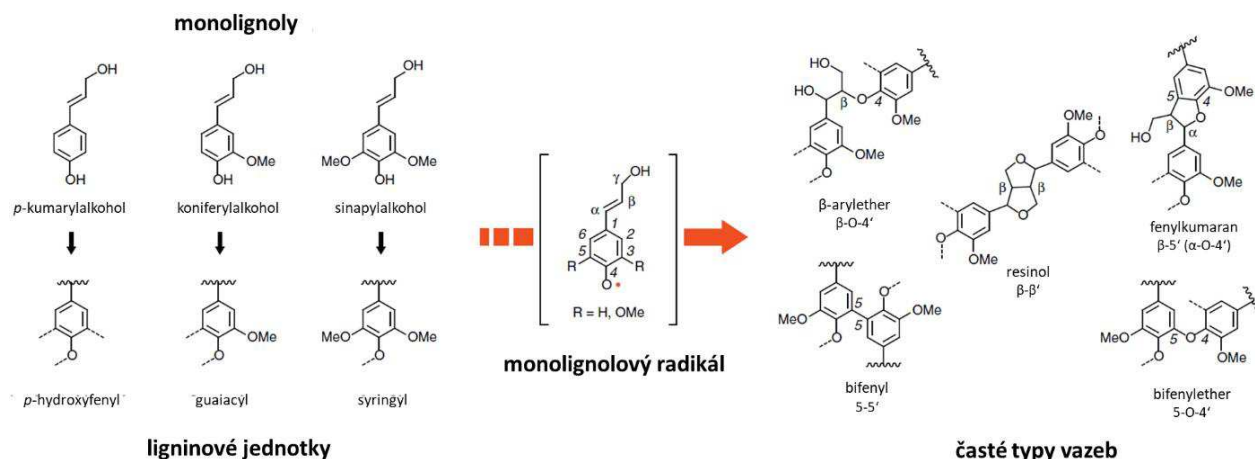
Lignocelulózové materiály jsou nejhojněji se vyskytující přírodní zdroj na Zemi, jedná se o biomasu suchozemských rostlin [160]. Hlavními složkami lignocelulóz jsou celulóza, hemicelulóza a lignin. Složení lignocelulóz je značně různorodé, a to především v závislosti na druhu rostliny (Tabulka 7), dalšími faktory jsou stáří rostliny a podmínky pěstování.

**Tabulka 7 Složení některých lignocelulózových materiálů (v % suché hmoty) [160].**

Surovina	Celulóza	Hemicelulóza	Lignin	Ostatní
Bagasa	40	24	25	11
Kukuřičná sláma	40	25	17	18
Kukuřičné klasy	39	35	15	11
Rýžová sláma	35	25	12	28
Pšeničná sláma	38	21	24	17
Pšeničná plevy	38	36	16	11
Proso prutnaté	45	31	12	12
Tvrdé dřevo	45	19	26	10
Měkké dřevo	44	22	28	6
Odpadní papír	76	13	11	0

Z chemického hlediska patří lignin mezi fenolické látky. Má silně rozvětvenou trojrozměrnou strukturu, kterou tvoří základní stavební jednotky nazývané monolignony. Monolignoly jsou deriváty hydroxyskořicového alkoholu (hydroxycinnamylalkoholu). Konkrétně to jsou *p*-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol (Obrázek 12) [161]. Tyto monolignoly jsou odvozeny od fenylalaninu a vznikají fenylpropanoidní dráhou během procesu lignifikace, který je nedílnou součástí druhotného tloustnutí cévnatých rostlin.





**Obrázek 12 Struktura ligninu.** Lignin se skládá ze tří hlavních monomerních jednotek. Proces lignifikace zahrnuje oxidaci monomeru na fenoxylový radikál, poté následují náhodné radikálové reakce, které vedou k prodloužení polymeru a vzniku polymerní sítě. Sloučeniny vpravo zobrazují hlavní typy vazeb uplatňujících se ve struktuře ligninu. Převzato z [162], upraveno.

Polymerace ligninu začíná enzymaticky katalyzovanou dehydrogenací monolignolů za tvorby monolignolových radikálů [163]. Tyto radikály jsou navzájem propojovány a vznikají příslušné ligninové jednotky *p*-hydroxyfenyl, guaiacyl and syringyl. Připojování monolignolů do polymeru probíhá prostřednictvím dvou typů vazeb, a to buď etherovými vazbami nebo vazbami uhlík-uhlík. V případě propojení uhlík-uhlík se vyskytují konkrétně vazby (β-β', β-5' a 5-5'). Druhým typem vazeb jsou etherové vazby (α-O-4', β-O-4' a 4-O-5'), přičemž β-O-4' vazba je vůbec nejčastější. Jednotlivé typy vazeb jsou zobrazeny na obrázku 12. Proces prodlužování polymeru probíhá nejčastěji spojením oligomer-oligomer nebo připojováním jednotlivých monomerů k oligomeru [164]. Reakce dvou monomerů jsou méně časté. Současně dochází i ke vzniku chemických vazeb mezi ligninem a hemicelulózou [165].

V rostlinných tkáních lignin vyplňuje prostor mezi celulózą a hemicelulózą, vzájemně je propojuje a zajišťuje pevnost a tuhost výsledné struktury [166]. S hemicelulózą, nejčastěji s glukomannanem a xylanem, je lignin vázán kovalentně, oproti tomu s celulózą je spojen za pomoci vodíkových můstků. Dohromady tyto biopolymery tvoří velmi pevnou strukturu, což představuje problém při izolaci ligninu, během které je nutné tyto vazby rozrušit. Kromě opěrné funkce se lignin podílí v rostlinách na transportu vody a tvoří bariéru, která brání jejímu nadměrnému výparu [167]. Dále lignin poskytuje ochranu před bakteriálními patogeny.

### 2.6.1. Metody izolace ligninu

Z důvodu chemické i enzymatické odolnosti ligninu představuje jeho izolace technicky náročný proces. Lignin může být izolován z celé řady lignocelulózových materiálů. [161]. Většina ligninu je vyrobena v papírenském a celulóžovém průmyslu (50–70 milionů tun ročně) uplatněním postupů, jejichž účelem je odstranění ligninu z lignocelulózových surovin během rozvlákňování dřevní štěpky [168].

Existují i další více sofistikované metody, které jsou ohleduplnější k životnímu prostředí. Produktem každé z metod je specifický lignin, který může být získáván ve formě (1) pevných nerozpustných reziduí, (2) precipitátu nebo přímo jako (3) směs depolymerizovaných

produktů [169]. V závislosti na zvolené metodě se liší vlastnosti izolovaného ligninu [164]. Izolační techniky lze rozdělit do dvou hlavních skupin. První zahrnuje delignifikační metody, během nichž je lignin uvolňován z lignocelulózové biomasy, zatímco hemicelulózy zůstávají v delignifikované biomase [169]. Podle konkrétní metody je lignin získáván ve formě pevného precipitátu nebo jako depolymerizovaný ligninový „olej“. Druhá skupina metod spočívá v konverzi a rozpuštění uhlovodíkových frakcí. V tomto případě je výsledný lignin izolován jako nerozpustná rezidua nebo precipitát.

### **2.6.2. Delignifikační metody**

Delignifikační metody dále dělíme podle hodnoty pH při kterých proces probíhá. Principem metod probíhajících v alkalickém prostředí je delignifikace biomasy a rozpuštění ligninu, tento způsob je velmi častý v papírenském a celulóзовém průmyslu.

#### ***Kraft lignin***

Nejčastější ze všech používaných metod je sulfátový neboli kraft proces. Jedná se o nejběžnější a nejeffektivnější způsob zpracování dřevní štěpky na buničinu [170]. Během kraft procesu je dřevní štěpka vařena ve vodném roztoku hydroxidu sodného (NaOH) a sulfidu sodného (Na<sub>2</sub>S) při 165–175 °C [168]. V těchto podmínkách jsou makromolekuly ligninu štěpeny na menší fragmenty, tudíž klesá molekulová hmotnost ligninu a dochází k jeho rozpuštění, během kterého přejde do roztoku 90-95 % ligninu. Primárním produktem je buničina a vedlejším produktem je černý roztok, který obsahuje rozpuštěný lignin. V průmyslové výrobě je tento roztok spalován, což umožňuje recyklaci Na<sub>2</sub>S. Dochází k rekuperaci tepelné energie i výchozích chemikálií. Z černého roztoku je možné tento kraft lignin izolovat například precipitací přidáním kyseliny sírové nebo chlorovodíkové [171]. Takto získaný kraft lignin je značně zesíťovaný, silně alkalické prostředí způsobuje snižování obsahu β-O-4' vazeb a jejich nahrazování C-C vazbami. Další nevýhodou je, že kraft lignin obsahuje velkým množstvím inkorporované síry ve formě thiolových skupin.

#### ***Sulfitový lignin***

Tato metoda je druhou nejběžnější při výrobě buničiny, nicméně v poledních letech je nahrazována výhodnější kraft metodou. Sulfitový postup může probíhat za jakéhokoli pH podle zvolené siřičitanové soli [169]. Používá se vodný roztok hydrogensířičitanu sodného, vápenatého, hořečnatého nebo amonného. Dochází k sulfonaci reaktivních α-pozic, což vede ke vzniku benzylsulfonátových skupin. Přítomnost těchto sulfonátových skupin zvyšuje rozpustnost ligninu ve vodě. Za teploty 145 °C se lignin rozpouští ve formě lignosulfonátu a opět vzniká černý roztok. Výsledný produkt může být izolován ultrafiltrací, extrakcí nebo srážením [164]. Ve srovnání s kraft metodou obsahuje sulfitový lignin větší množství síry.

#### ***Soda lignin***

Třetím tradičním procesem rozvlákňování je soda proces, který byl v 19. století používán při zpracování lignocelulózových surovin s výjimkou dřeva (tj. len, sláma, bagasa) na vláknu [166]. Proces je podobný jako kraftové rozvlákňování, ale není využit Na<sub>2</sub>S. Biomasa je přidána do vodného roztoku NaOH a je zahřata na přibližně 160 °C. Vzhledem

k nepřítomnosti silného nukleofilu, probíhá alkalická depolymerace méně efektivně. Depolymerizační reakce ligninu probíhá štěpením  $\alpha$  a  $\beta$  etherových vazeb, což vede k tvorbě volných fenolových skupin [164].

Účinnost soda procesu může být zvýšena přidáním antrachinonu (AQ) [169]. Přesný mechanismus působení není znám, ale AQ zřejmě podporuje štěpení etherových vazeb a současně, díky svým redoxním vlastnostem, omezuje „peeling“ neboli postupné odštěpování monosacharidových jednotek z redukujícího konce polymeru celulózy a hemicelulóz [172]. Hlavní výhodou soda procesu s AQ je, že získaný soda lignin neobsahuje síru, na rozdíl od kraft nebo sulfitového ligninu. Pro soda lignin s AQ je charakteristický nízký obsah  $\beta$ -O-4' vazeb a lze jej izolovat srážením.

### ***Postup s využitím organických rozpouštědel***

Za využití organických rozpouštědel lze v kyselém prostředí relativně snadno izolovat vysoce čistý lignin [168]. Provádí se za zvýšené teploty 180–195 °C pomocí vodných roztoků organických rozpouštědel jako jsou ethanol, methanol, cyklické ethery a organické kyseliny (octová, mravenčí) nebo jejich směsi. Působením organických rozpouštědel se lignin rozpouští do roztoku a z něj může být získáván precipitací. Během rozpouštění dochází k intenzivnímu štěpení  $\alpha$ -O-4' a  $\beta$ -O-4' vazeb, naopak četnost bifenylových 5-5' vazeb roste, což ovlivňuje reaktivitu ligninu. [166]. Obdobně jako při soda rozvlákňování i během této metody se nepoužívají sirné sloučeniny a výsledný lignin tedy neobsahuje síru, další výhodou je, že je rozpustný v organických rozpouštědlech. Z důvodu vysoké spotřeby organických rozpouštědel je ale tento způsob izolace ligninu finančně nákladný.

### **2.6.3. Konverzní metody**

Druhá kategorie frakcionačních metod spočívá v konverzi (hydrolýze nebo termolýze) sacharidů.

#### ***Hydrolýza koncentrovanou kyselinou***

Lignocelulóзовé suroviny je možné hydrolyzovat koncentrovanými kyselinami na směsi bohaté na monosacharidy. Koncentrovaná kyselina sírová je přidána k biomase při pokojové teplotě, za vzniku vodného roztoku převážně oligomerů sacharidů [169]. Následně je přidána zředěná  $H_2SO_4$  a směs je zahřívána, čímž dojde k další hydrolýze, jejímž výsledkem je směs monosacharidů. Působením kyseliny ligninová frakce značně degraduje, dochází ke štěpení etherových vazeb. Většina ligninu je získána ve formě vysoce kondenzovaných nerozpustných reziduí [173]. Použitou  $H_2SO_4$  lze obtížně regenerovat a využití koncentrované  $H_2SO_4$  způsobuje problémy s korozí zařízení, což jsou důvody, které brání využití této metody ve větším rozsahu.

#### ***Enzymatická hydrolýza***

Narušení pevné struktury lignocelulóзу může být kromě chemických metod dosaženo působením enzymů. Jde o běžnou metodu pro uvolnění monosacharidů z polysacharidů, které se nacházejí v lignocelulóзовé biomase, pomocí celulólitických a hemicelulólitických enzymů [174]. Současně jsou kromě monosacharidů získána jako vedlejší produkt pevná

rezidua, která obsahují ve vodě nerozpustnou frakci bohatou na lignin. Čistota ligninu získaného enzymatickou hydrolýzou je nízká, odpadní materiál obsahuje mimo ligninu proteiny a zbytky sacharidů. Proto byly zkoumány další možnosti valorizace těchto vedlejších produktů a byly nalezeny postupy pro izolaci ligninu s minimální strukturální změnou a vysokým obsahem  $\beta$ -O-4' vazeb.

#### **2.6.4. Antioxidační vlastnosti ligninu**

Lignin je heteropolymerní aromatická sloučenina, která obsahuje aromatická jádra substituovaná hydroxylovými a methoxylovými funkčními skupinami. Antioxidační vlastnosti ligninu jsou spojené s těmito funkčními skupiny, které mohou zhášet volné radikály poskytnutím svých elektronů [163]. Antioxidační aktivita byla popsána u celé řady různých ligninů. Bylo zjištěno, že antioxidační kapacita souvisí s množstvím přítomných hydroxylových a methoxylových skupin, jejichž obsah ovlivňuje kromě původu ligninu také způsob jeho izolace. Obecně je antioxidační aktivita ligninu negativně ovlivněna zvyšující se heterogenitou, disperzitou, průměrem molekulové hmotnosti a příměsemi uhlovodíků, které mohou kontaminovat lignin při izolaci [175, 176].

V oblasti materiálových aplikací byla zkoumána antioxidační aktivita ligninu s cílem využít ho jako náhradu syntetických antioxidantů, které se přidávají při výrobě polyolefinů jako stabilizátory [175]. Začlenění ligninu do syntetických polymerů může zvýšit odolnost těchto materiálů proti foto- a tepelné oxidaci [176]. Byly provedeny studie potvrzující pozitivní vliv ligninu na oxidační stabilitu PE [177], PP [178, 179] nebo polyuretanů [180]. Antioxidační účinnost ligninu v polymerech souvisí s jeho rozpustností v daném materiálu, a také s jeho strukturou [180].

Antioxidační aktivita ligninu může být využita při výrobě aktivních potravinářských obalů, které jsou určené pro zvýšení udržitelnosti mastných potravin [181]. Ze studie zkoumající využití ligninu jako plniva pro PLA vyplývá, že antioxidační aktivita připraveného obalu rostla v závislosti na dávce, a to až do 10% obsahu ligninu [175]. Dále byl zkoumán přírůstek ligninu k PVA. Z výsledků je patrné, že lignin signifikantně zvýšil antioxidační aktivitu potravinového obalu a zároveň splňoval kritéria bezpečnosti, zkoumaná pomocí migračních testů [181].

Díky biokompatibilitě a antioxidačním vlastnostem, na kterých je založena většina prospěšných efektů, je lignin zkoumán také ve vztahu k lidskému organismu. Možné aplikace jsou studovány v léčbě obezity, diabetes mellitus, trombózy, virových infekcí nebo karcinomů [182].

#### **2.7. Motivace práce**

Potravinové obaly vyráběné z konvenčních plastů představují zátěž pro životní prostředí. Polyhydroxyalkanoáty jsou kompostovatelné biopolymery, které díky svým vlastnostem mají potenciál syntetické, nebiodegradovatelné plasty nahradit. Většímu rozšíření běžného využití PHA brání omezené mechanické vlastnosti, nízká tepelná odolnost a především vysoké produkční náklady.

Valorizací odpadů z potravinářského průmyslu je možné tyto náklady snížit. Byly navrženy různé postupy využití odpadů, například odpadního potravinářského oleje [183], kávové

sedliny [184] nebo odpadního živočišného tuku z masném průmyslu [185], jako levného zdroje nutrientů pro kultivaci mikrobiálních producentů PHA. Odpadní suroviny se dají také použít jako aktivní aditivum pro PHA. Do této skupiny materiálů patří i lignin. V diplomové práci jsme izolovali lignin z hroznových výlisků, které jsou odpadem ve vinařském průmyslu, a použili ho jako aktivní aditivum pro PHA. Lignin byl do polymeru přidán jako aktivní aditivum za účelem zlepšení mechanických vlastností, bariérových vlastností a tepelné odolnosti kopolymeru. Výsledný materiál by mohl být využit jako plně kompostovatelný aktivní obal pro potraviny vyrobený čistě z obnovitelných zdrojů. Důležitou hypotézou, která byla v práci sledovaná, bylo využití antioxidačních vlastností ligninu.

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **3.1. Použité přístroje**

Vakuová sušárna Vacuo-temp (J.P. Selecta, Španělsko)

Komorová pec LE 05/11 (LAC, Česká republika)

UV-VIS spektrometr Helios Delta (Thermo Spectronic, USA)

FTIR spektrometr Frontier (Perkin Elmer, USA)

Analyzátor prvkového složení EuroVector EA 3000 (EuroVector, Itálie)

Analyzátor propustnosti VAC-V1 (Labthink, USA)

Teplotně modulovaný kalorimetr DSC 8000 (Perkin Elmer, USA)

Termogravimetrický analyzátor TGA Q5000IR (TA Instruments, USA)

Zkušební stroj Instron 3365 (Instron, USA).

#### **3.2. Použité chemikálie**

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), (Sigma-Aldrich, Německo)

Acetanhydrid 98%, (Sigma-Aldrich, Německo)

Ethanol (UV-VIS), (Lach-ner, Česká republika)

Hydroxid sodný  $\geq 99\%$ , (Carl Roth, Německo)

Chloroform ROTIPURAN  $\geq 99\%$  p.a., (Carl Roth, Německo)

Joncryl<sup>R</sup> ADR 4468, (BASF Corporation, USA)

Kyselina chlorovodíková 37%, (Lach-ner, Česká republika)

Pyridin 99.9%, (Sigma-Aldrich, Německo)

Peroxosíran draselný, (Sigma-Aldrich, Německo)

#### **3.3. Biologické suroviny**

Hroznové výlisky pocházely z vinařství Vavříček, které se nachází v Březí u Mikulova. Jednalo se o výlisky bílých odrůd vinné révy Veltlínské zelené a Sauvignon Blanc ze sklizně v roce 2018.

Poly(3-hydroxybutyrát) Hydal, s průměrnou molekulovou hmotností 350 kDa a polydisperzitou 1,2, byl získán darem od společnosti Nafigate Corporation (Praha, Česká republika).

Amorfní polyhydroxyalkanoát Mirel grade byl darován firmou Metabolix (Cambridge, USA).

#### **3.4. Izolace ligninu**

##### ***Předúprava***

Surovinou pro izolaci ligninu byly hroznové výlisky, které byly uchovávány v mrazáku při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V rámci předúpravy byly hroznové výlisky rozmrazeny a vysušeny v sušárně při

40 °C. Dále byly pomocí síta oddělena hroznová semena od slupek. Semena i slupky byly rozemlety a byl z nich extrahován olej pomocí hexanu.

### ***Izolace***

Soda lignin byl izolován z připravených semínek nebo slupek dle postupu [186].

### ***Acetylace ligninu***

Nejdříve byl izolován lignin a poté byl promytý filtrační koláč přesunut do Simax lahve 250 ml a na 2 g ligninu bylo přidáno 8 ml pyridinu a 56 ml acetanhydridu (poměr pyridinu ku acetanhydridu byl 1:7). Směs byla míchána alespoň 10 hodin. Roztok byl pomalu přelit do druhé Simax láhve 500 ml, která byla z půlky naplněna destilovanou vodou a poté byla doplněna vodou po okraj. Následně byla směs míchána 24 hodin. Směs byla přefiltrována přes Büchnerovu nálevku a promyta destilovanou vodou do neutrální hodnoty pH, filtrační koláč byl vysušen v sušárně při 37 °C [200].

## **3.5. Charakterizace ligninu**

### **3.5.1. Stanovení popela**

Porcelánový kelímek byl vyžihán v muflové peci při  $500 \pm 25$  °C po dobu 30 minut. Kelímek byl ponechán, dokud teplota neklesla na 200 °C a poté byl přemístěn do exikátoru, dokud nevychladl na pokojovou teplotu. Do zvážení kelímku s přesností na 4 desetinná místa bylo naváženo 0,25–1 g vysušeného vzorku a kelímek byl položen na elektrickou plotýnku do zuhelnatění vzorku. Poté byl kelímek vložen do muflové pece, kde byl žihán při  $550 \pm 25$  °C po dobu 4 hodin. Následně byl kelímek s popelem vložen do exikátoru a po vychladnutí byl zvážěn s přesností na 4 desetinná místa.

Hmotnost popelu byla vypočítána z rozdílu hmotností prázdného kelímku a kelímku se vzorkem, respektive s popelem dle rovnice (1). Hmotnost popelu byla vyjádřena v hmotnostních procentech  $w_p$ :

$$w_p = \frac{m_1 - m_2}{m_3 - m_2} \cdot 100 [\%] \quad (1)$$

Kde  $m_1$  je hmotnost kelímku s popelem,  $m_2$  je hmotnost prázdného kelímku po vyžihání,  $m_3$  je hmotnost kelímku se vzorkem a  $w_p$  je obsah popela ve hmotnostních procentech.

### **3.5.2. Prvková analýza**

Byla provedena prvková analýza ligninových vzorků pomocí přístroje EuroVector EA 3000 (EuroVector, Italy). Stanovovány byly prvky nejčastěji zastoupené v organických materiálech, tedy uhlík, dusík, vodík, síra a kyslík. Konkrétně byly analyzovány 4 skupiny vzorků, a to soda lignin a acetylovaný lignin vždy ze semen i slupek. Od každého vzorku bylo naváženo přibližně 50 mg, vždy ve 3 opakováních. Analýza byla provedena dle postupu [187]. Jako standard byl použit Sulfanilamid. Analýza probíhala při teplotě 980 °C s konstantním proudem hélia. Vzniklé plynné produkty N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O a SO<sub>2</sub> byly separovány v chromatografické koloně a detekovány teplotně vodivostním detektorem.

### 3.5.3. Měření FTIR

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) byla provedena na spektrofotometru Frontier (Perkin Elmer, USA) v ATR (attenuated total reflectance) módu (krystal diamant/ZnSe, LiTaO<sub>3</sub> detektor). Všechna spektra byla naměřena v rozsahu vlnočtů 600 až 4000 cm<sup>-1</sup>. Počet skenů, který vyjadřuje počet spekter kumulovaných v rámci jednoho stanovení, byl stanoven na 8 a rozlišení 2 cm<sup>-1</sup>. Všechna spektra byla korigována a normalizována k nejvyššímu píku.

### 3.6. Příprava PHA filmů

Do Simax láhve 100 ml bylo naváženo požadované množství PHA a poté byl přidán chloroform v objemu, aby výsledná koncentrace roztoku byla 5 hmotnostních %. Směs byla míchána a zahřívána na 90 °C po dobu 30 minut. K roztoku bylo poté přidáno 10 % Ioncrylu a směs byla zahřívána dalších 10 minut. Následně byl horký roztok vylit do Petriho misky a byl v ní ponechán, dokud se neodpařil chloroform. Výsledný film byl vysušen v sušárně při 37 °C po dobu 48 hodin a ve vakuové sušárně při 37 °C po dobu 60 minut, hodnota vakua byla -66 cm Hg.

#### *Příprava PHA filmů s ligninovým plnivem*

Lignin byl rozpouštěn ve skleněné lahvičce v chloroformu (1% roztok) minimálně 15 hodin. Příprava PHA filmu probíhala dle výše popsaného postupu a rozpuštěný lignin byl přidán společně s Ioncrylem do roztoku PHA. Dále bylo postupováno stejně jako u čistého PHA filmu.

### 3.7. Charakterizace PHA filmů

#### 3.7.1. Bariérové vlastnosti

Bariérové vlastnosti PHA filmů o průměru 97 mm byly stanovovány na přístroji k testování propustnosti plynů VAC-V1 (Labthink, USA). Analýza bylo provedena pro přechod kyslíku, oxidu uhličitého, dusíku a vzduchu. Použité plyny měly čistotu 99,9 % pro O<sub>2</sub> a 99 % pro CO<sub>2</sub> a N<sub>2</sub>. Při zkoušce byl film umístěn do zkušební komory, kterou předěloval na dvě části. Obě části komory byly na začátku stanovení evakuovány a následně byl do jedné části komory přiváděn zkušební plyn. Díky rozdílným tlakům zkušební plyn přecházel přes film do druhé části komory, kde byl sledován tlak jako funkce času v kalibrovaném objemu. Rychlost přenosu plynu (GTR, gas transmission rate) udávaný v jednotkách  $\frac{\text{cm}^3}{\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h} \cdot 0,1 \text{ MPa}}$  byl vyhodnocen podle následující rovnice (2) odpovídající ISO 2556:

$$GTR = \frac{V_c}{R \cdot T \cdot p_a \cdot A} \cdot \frac{dp}{dt} \quad (2)$$

kde  $V_c$  je objem části komory s menším tlakem,  $T$  je testovací teplota,  $R$  je plynová konstanta,  $p_a$  je atmosférický tlak udávaný v Pascalech,  $A$  je efektivní plocha přenosu a  $dp/dt$  je změna tlaku na straně s nízkým tlakem za jednotku času po ustálení prostupu.

Koeficient propustnosti  $P$  udávaný v jednotkách  $\frac{\text{cm}^3 \cdot \text{cm}}{\text{m}^2 \cdot 24 \text{ h} \cdot 0,1 \text{ MPa}}$  a byl vypočten podle následující rovnice (3):

$$P = GTR \cdot l \quad (3)$$

kde  $l$  je tloušťka filmu v cm.



### 3.7.2. Stanovení antioxidační aktivity

Zkoumání antioxidační aktivity připravených filmů bylo provedeno metodou založenou na eliminaci radikálů  $ABTS^{\bullet+}$  použité v práci [188]. Byl připraven roztok ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) o koncentraci  $c = 7 \text{ mM}$  naředěním zásobního koncentrátu destilovanou vodou. Radikálový kation  $ABTS^{\bullet+}$  byl získán reakcí s 2,45 mM peroxodisíranem draselným. Roztok byl ponechán ve tmě po dobu 12 hodin.

Před použitím byl  $ABTS^{\bullet+}$  naředěn (UV-VIS) ethanolem, aby výsledný roztok měl absorpční 0,70 ± 0,02 při 734 nm. Vzorky připravených filmů o velikosti 0,5 až 10 cm<sup>2</sup>, což odpovídalo hmotnosti 0,0074 až 0,1477 g, byly dány do zkumavky a vzápětí bylo přidáno 20 ml naředěného roztoku  $ABTS^{\bullet+}$ . U všech roztoků byla změřena absorbance v čase 0 a 60 minut. Vzorky byly po celou dobu uchovávány ve tmě při pokojové teplotě.

Počet molů radikálu  $ABTS^{\bullet+}$  který reagoval se vzorkem, byl vypočítán dle rovnice (4) a použit pro zhodnocení antioxidační aktivity pomocí rovnice (5):

$$S_m = (A_0 - A_t) \cdot \text{mol } ABTS^{\bullet+} \quad (4)$$

Kde  $S_m$  vyjadřuje počet zreagovaných molů  $ABTS^{\bullet+}$ ,  $A_0$  je hodnota absorbance vzorku při 734 nm v čase 0, respektive pro  $A_t$  v čase 60 minut.

$$S_{\%} = 100 - \frac{\text{mol } ABTS^{\bullet+} - S_m}{\text{mol } ABTS^{\bullet+}} \cdot 100 \quad (5)$$

Kde  $S_{\%}$  představuje procentuální vyjádření antioxidační aktivity.

### 3.7.3. Studium termálních vlastností kompozitních filmů

#### *Diferenční skenovací kalorimetrie*

Analýza vzorků metodou diferenční snímací kalorimetrie (DSC) byla provedena na přístroji DSC 8000 (Perkin Elmer, USA) v dusíkové atmosféře. Kalibrace DSC byla provedena pomocí indii s vysokou čistotou. Přibližně 10 mg vzorku bylo hermeticky uzavřeno do hliníkových pánviček. Testování probíhalo podle neizotermického protokolu, který zahrnoval první zahřívací a ochlazovací cyklus a poté druhý zahřívací cyklus. Při cyklech byly použity tyto teplotní rozsahy, první zahřívání probíhalo z 25 °C na 190 °C, ochlazení z 190 °C na -20 °C a druhé zahřívání z -20 °C na 190 °C, přičemž rychlost zahřívání, respektive chlazení byla -10 °C·min<sup>-1</sup>.

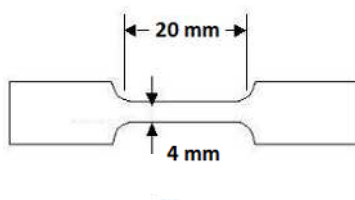
#### *Termogravimetrická analýza*

Byla provedena termogravimetrická analýza (TGA) pomocí přístroje TGA Q5000IR (TA Instruments, USA) ve vzduchové atmosféře s průtokem vzduchu 30 ml·min<sup>-1</sup>. Přibližně 5 mg vzorku bylo uzavřeno v hliníkovém tavicím kelímku a zahříváno z 25 °C na 500 °C, rychlostí zahřívání byla 10 °C·min<sup>-1</sup>.

### 3.7.4. Charakterizace mechanických vlastností kompozitů

Vzorky PHA filmů byly vyříznuty na požadovaný tvar zkušební tělesa. Tloušťka zkušební tělesa ve tvaru oboustranné lopatky byla 0,2 mm a těleso bylo dlouhé 20 mm (Obrázek 13).

Mechanické vlastnosti PHA filmů byly měřeny na zkušebním přístroji Instron 3365 (Instron, USA). Použitá rychlost deformace byla  $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Z naměřených výsledků byly vypočteny průměrné hodnoty Youngova modulu, pevnosti v tahu  $\sigma_B$ , délkového prodloužení při přetržení  $\varepsilon_B$  a příslušné směrodatné odchylky.



Obrázek 13 Zkušební těleso

### 3.8. Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení naměřených dat byla použita Welchova ANOVA a Brown-Forsytheův test, které byly provedeny pomocí programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, USA).

## 4. VÝSLEDKY

Popsaným způsobem se podařilo izolovat lignin z hroznových semen i slupek. Postupnou optimalizací izolačního postupu bylo dosaženo výtěžku ligninu  $0,095 \pm 0,003$  g/g semen a  $0,259 \pm 0,059$  g/g slupek. Výtěžek tedy činil 9,5 % pro hroznová semena, respektive 25,9 % pro slupky.

### 4.1. Popel

Vážkové stanovení popela představuje hrubý ukazatel obsahu minerálních látek. Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky obsahu popela jsou uvedeny v tabulce 8.

**Tabulka 8 Procentuální zastoupení popela v ligninu.**

Vzorek	$w_p$ [%]
Soda lignin semínka	$7,41 \pm 0,78$
Soda lignin slupky	$1,97 \pm 2,19$
Acetylovaný lignin semínka	$0,56 \pm 0,10$
Acetylovaný lignin slupky	$0,06 \pm 0,03$

$w_p$  – obsah popela ve hmotnostních procentech.

Z výsledků je patrné, že zastoupení minerálních látek v soda ligninu z hroznových semínek je výraznější než v soda ligninu ze slupek. Dále z výsledků vyplývá, že proces acetylace soda ligninů způsobil řádový pokles obsahu minerálních látek.

### 4.2. Prvková analýza

Analýza obsahu základních prvků, které se vyskytují v organických sloučeninách, tedy uhlík, vodík, dusík a síra, se provádí v rámci běžné charakterizace polymerních materiálů. Všechny vzorky byly měřeny ve třech opakováních. V tabulce 9 jsou uvedeny vypočítané průměrné hodnoty a směrodatná odchylka procentuálního zastoupení prvků v ligninu. Prvkové zastoupení je graficky zobrazeno na obrázku 14.

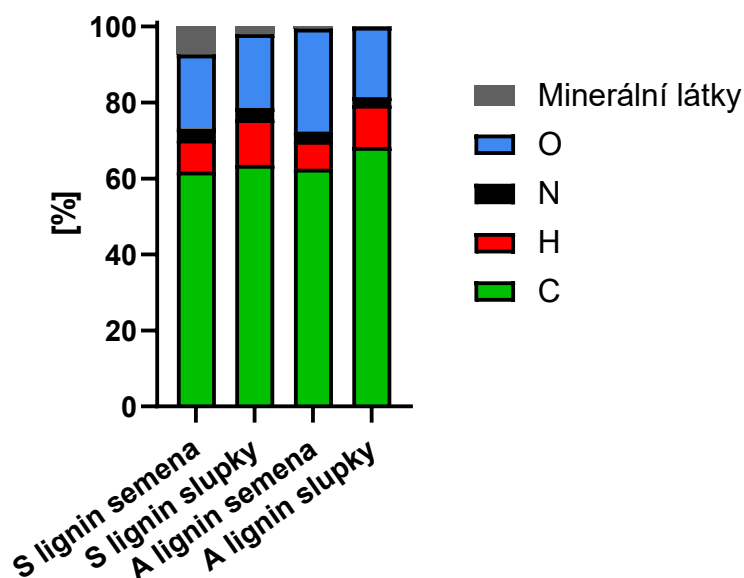
**Tabulka 9 Prvkové složení vzorků ligninu.**

Vzorek	C [%]	H [%]	N [%]	S [%]	O [%]
Soda lignin semínka	$61,807 \pm 0,820$	$8,451 \pm 0,192$	$2,929 \pm 0,078$	0	19,404
Soda lignin slupky	$63,626 \pm 0,597$	$12,031 \pm 0,186$	$2,947 \pm 0,055$	0	19,426
Acetylovaný lignin semínka	$62,602 \pm 0,377$	$7,317 \pm 0,057$	$2,415 \pm 0,144$	0	27,107
Acetylovaný lignin slupky	$68,336 \pm 0,456$	$11,043 \pm 0,693$	$2,081 \pm 0,009$	0	18,479

Procentuální zastoupení kyslíku bylo dopočítáno po odečtení všech naměřených prvků a minerálních látek.

Lignin izolovaný z hroznových výlisků nebyl díky použité metodě izolace kontaminován sírou a to je výhodou oproti kraft ligninu, který obsahuje skupiny  $\text{SO}_3$  [166]. Absence síry je výhodná pro další použití ligninu [189]. Průměrný procentuální obsah uhlíku byl u acetylovaných forem ligninu vyšší než u odpovídajících soda ligninů, tento výsledek byl v souladu s očekáváním. Během acetylace dochází k nahrazení hydroxylových skupin skupinami acetylovými, což vede ke zvýšení obsahu atomů uhlíku. Obsah vodíku byl u vzorků ligninu z hroznových slupek výrazně vyšší než u ligninu ze semínek. Acetylované vzorky neobsahovaly v porovnání se soda ligninem výrazně více vodíku. To bylo v rozporu s očekáváním kvůli vyššímu počtu vodíku v acetylových skupinách. Vzorky ligninu obsahovaly 2–3 % dusíku. Dusík se ve struktuře ligninu nenachází, což naznačuje přítomnost proteinů, které snižovaly čistotu ligninu [190]. Bylo publikováno, že hroznové výlisky obsahují 23 % proteinů [191].

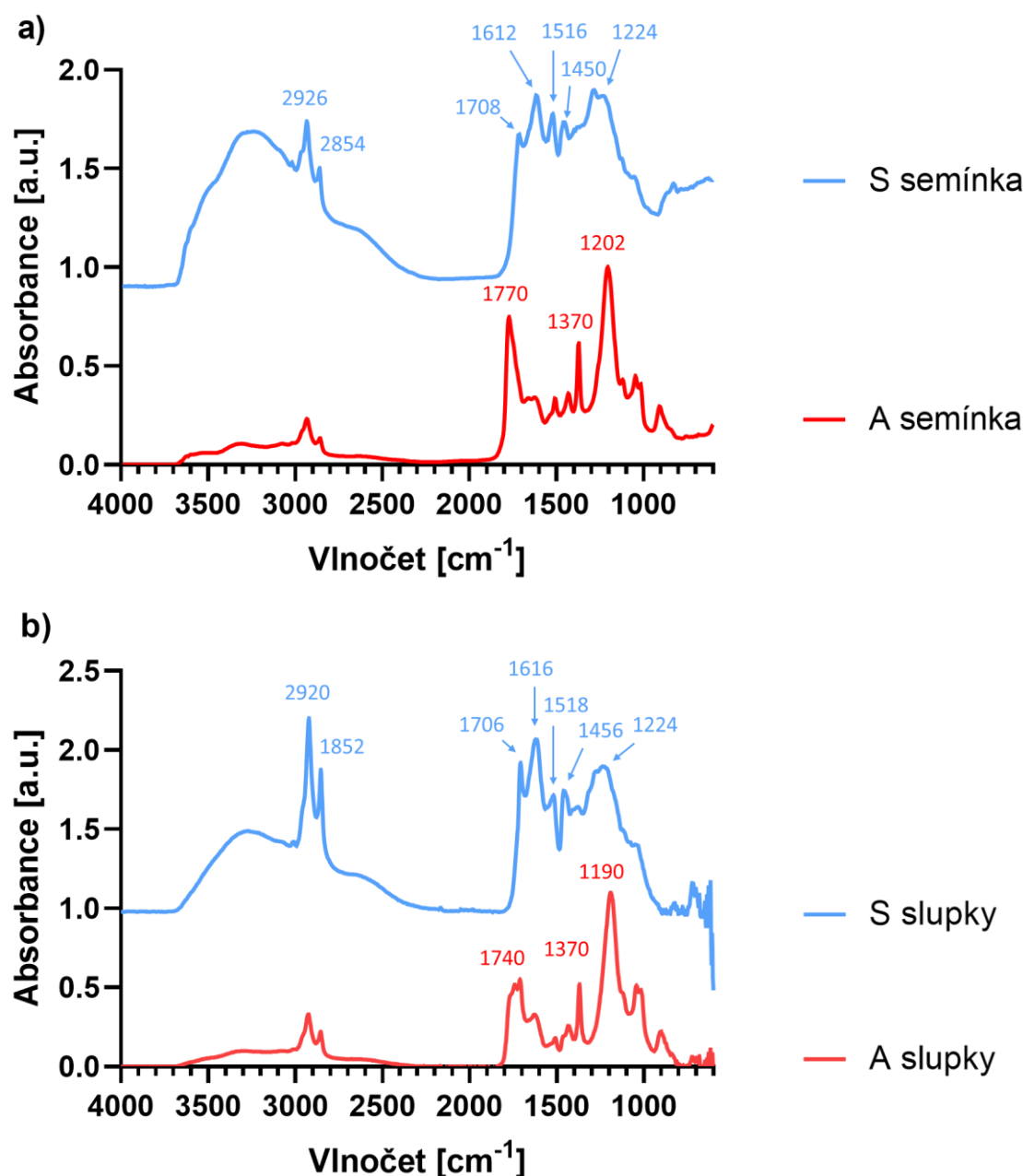
Procentuální zastoupení kyslíku bylo dopočítáno po odečtení všech prvků a minerálních látek. V důsledku acetylace došlo u ligninu ze semínek k nárůstu obsahu kyslíku o 7,7 %. Tento nárůst lze vysvětlit přítomností atomů kyslíku v acetylových skupinách. Vysoké procentuální zastoupení kyslíku u acetylovaného ligninu bylo způsobeno řádovým rozdílem obsahu minerálních látek těchto vzorků. Naopak u ligninu izolovaného z hroznových slupek vedla acetylace k poklesu poměrného zastoupení kyslíku, který způsobil procentuální nárůst obsahu uhlíku.



**Obrázek 14** Procentuální vyjádření prvkového složení ligninů. S lignin – soda lignin, A lignin – acetylovaný lignin

#### 4.3. FTIR

FTIR spektra ligninů izolovaných z hroznových semínek, slupek a jejich acetylované formy jsou zobrazeny na obrázku 15.



**Obrázek 15 FTIR spektra ligninových vzorků.** Na obrázku a) jsou zobrazena spektra soda ligninu a acetylovaného ligninu z hroznových zrníček a na obrázku b) spektra soda ligninu a acetylovaného ligninu z hroznových slupek. S – Soda lignin, A – Acetylovaný lignin, a.u. – arbitrary units.

Spektra soda ligninů si byla velmi podobná a byly na nich identifikovány následující pásy. Široký absorpční pás rozprostírající se od 3000 až do 3500  $\text{cm}^{-1}$ , který přísluší valenčním vibracím hydroxylových skupin [192, 193]. Dále absorpční pásy s maximy 2920 a 2852  $\text{cm}^{-1}$ , které odpovídají valenčním vibracím methylenových  $\text{CH}_2$  a methylenových  $\text{CH}_3$  skupin [192, 194–196]. Pás s vlnocetem 1705  $\text{cm}^{-1}$  náleží valenční vibraci karbonylové skupiny nebo karboxylové skupiny [103, 190, 194, 195], pravděpodobně kyseliny kumarové [197]. Pásky nacházející se kolem 1616 a 1518  $\text{cm}^{-1}$  jsou charakteristické pro vibrace aromatických jader fenypropanových jednotek [194, 195, 197]. Společně s píkem 1456  $\text{cm}^{-1}$ , který náleží deformační vibraci methylenových a methoxy skupin, odpovídají primární struktuře ligninu

[190, 196, 197]. Pás s vlnočtem  $1224\text{ cm}^{-1}$  potvrzuje přítomnost fenylové vazby a je typický pro syringylovou jednotku [191, 196].

Úspěšnou modifikaci acetylací ligninových vzorků potvrzují FTIR spektra (Obrázek 15). Na FTIR spektrech acetylovaných ligninů je silně redukován pás valenčních vibrací hydroxylových skupin mezi  $3000$  a  $3500\text{ cm}^{-1}$ , což naznačuje velkou účinnost acetylačního procesu [198–200]. Pás  $1770$  a  $1740\text{ cm}^{-1}$  náleží karbonylovým vazbám acetylových skupin, které mají alifatickou strukturu nebo jsou navázány na aromatické jádro [200, 201].

Symetrické deformační vibrace methylenových vazeb, které se nacházejí v acetylových skupinách, odpovídají pásu  $1370\text{ cm}^{-1}$  [193, 201, 202]. Silným pásem  $1203$  respektive  $1188\text{ cm}^{-1}$  je dále potvrzena esterová vazba. Ve spektrech acetylovaných ligninů nebyla pozorována žádná absorpce v oblasti  $1840$ – $1760\text{ cm}^{-1}$ , což dokazuje, že acetylované produkty neobsahovaly nezreagovaný anhydrid kyseliny octové [202].

#### 4.4. Bariérové vlastnosti

Analýza propustnosti plynů přes polymerní filmy, připravené ze směsi P3HB, amorfního PHA a soda ligninu izolovaného z hroznových semínek, byla provedena pro  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  a vzduch. Naměřená data shrnuje tabulka 10.

**Tabulka 10 Výsledky analýzy propustnosti plynů přes polymerní filmy s ligninem.**

Plyn	PHA + 1 % S lignin		PHA + 10 % S lignin	
	GTR	P	GTR	P
	$\frac{\text{cm}^3}{\text{m}^2 \cdot 24\text{hod} \cdot 0,1\text{MPa}}$	$\frac{\text{cm}^3 \cdot \text{cm}}{\text{m}^2 \cdot 24\text{hod} \cdot 0,1\text{MPa}}$	$\frac{\text{cm}^3}{\text{m}^2 \cdot 24\text{hod} \cdot 0,1\text{MPa}}$	$\frac{\text{cm}^3 \cdot \text{cm}}{\text{m}^2 \cdot 24\text{hod} \cdot 0,1\text{MPa}}$
$\text{O}_2$	7,295	0,062	6,128	0,086
$\text{CO}_2$	36,324	0,309	3,951	0,055
$\text{N}_2$	47,448	0,404	44,561	0,625
vzduch	15,47	0,132	34,969	0,490

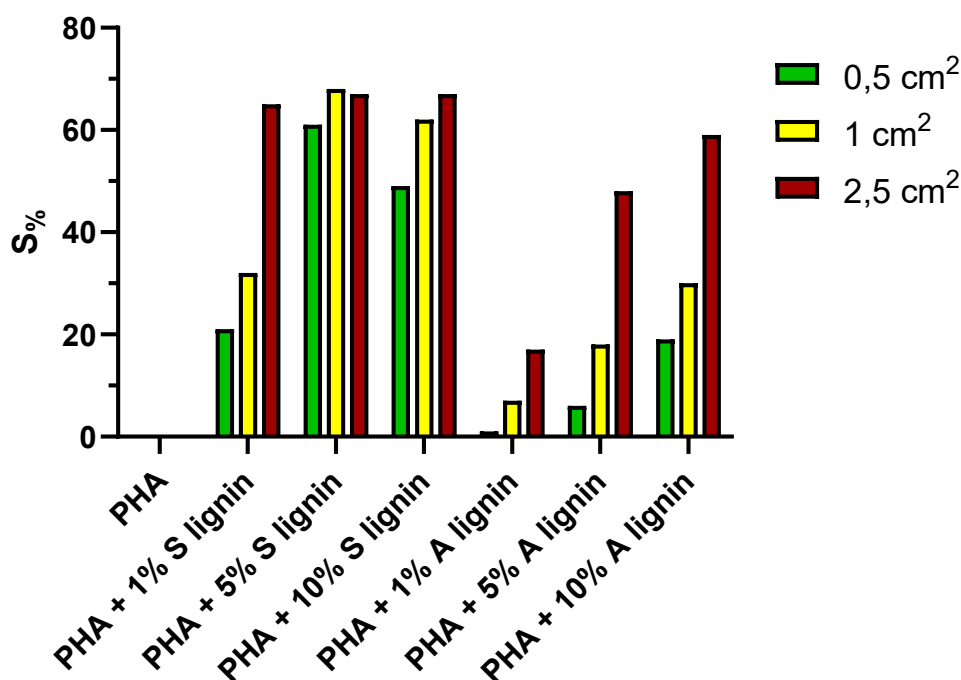
GTR – rychlost přestupu plynu (gas transmission rate), P – koeficient propustnosti, PHA – směs P3HB a amorfního PHA v poměru 1:1, S lignin – soda lignin.

Z naměřených dat je patrné že, v porovnání s jinými polymerními materiály (Tabulka 2) měly analyzované filmy velmi dobré bariérové vlastnosti. Byly analyzovány polymerní filmy s 1 a 10 % ligninu. Navýšení podílu ligninu snížilo propustnost pro  $\text{CO}_2$ . Naopak pro ostatní plyny došlo k mírnému navýšení propustnosti.

#### 4.5. Antioxidační aktivita

K vytvoření aktivního obalu je možné použít dvě strategie. První spočívá v uvolňování většinou nízkomolekulárních látek do potravin, druhá je založena na principu odstraňování nežádoucích látek materiálem obalu [203]. Obaly s antioxidačním účinkem patří mezi druhé zmíněné a vychytávají kyslík nebo volné radikály. Schopnost zhášení volných radikálů využívá i směsný polymerní materiál zkoumaný v této práci. Antioxidační aktivitu lze jednoduše stanovit ABTS testem.

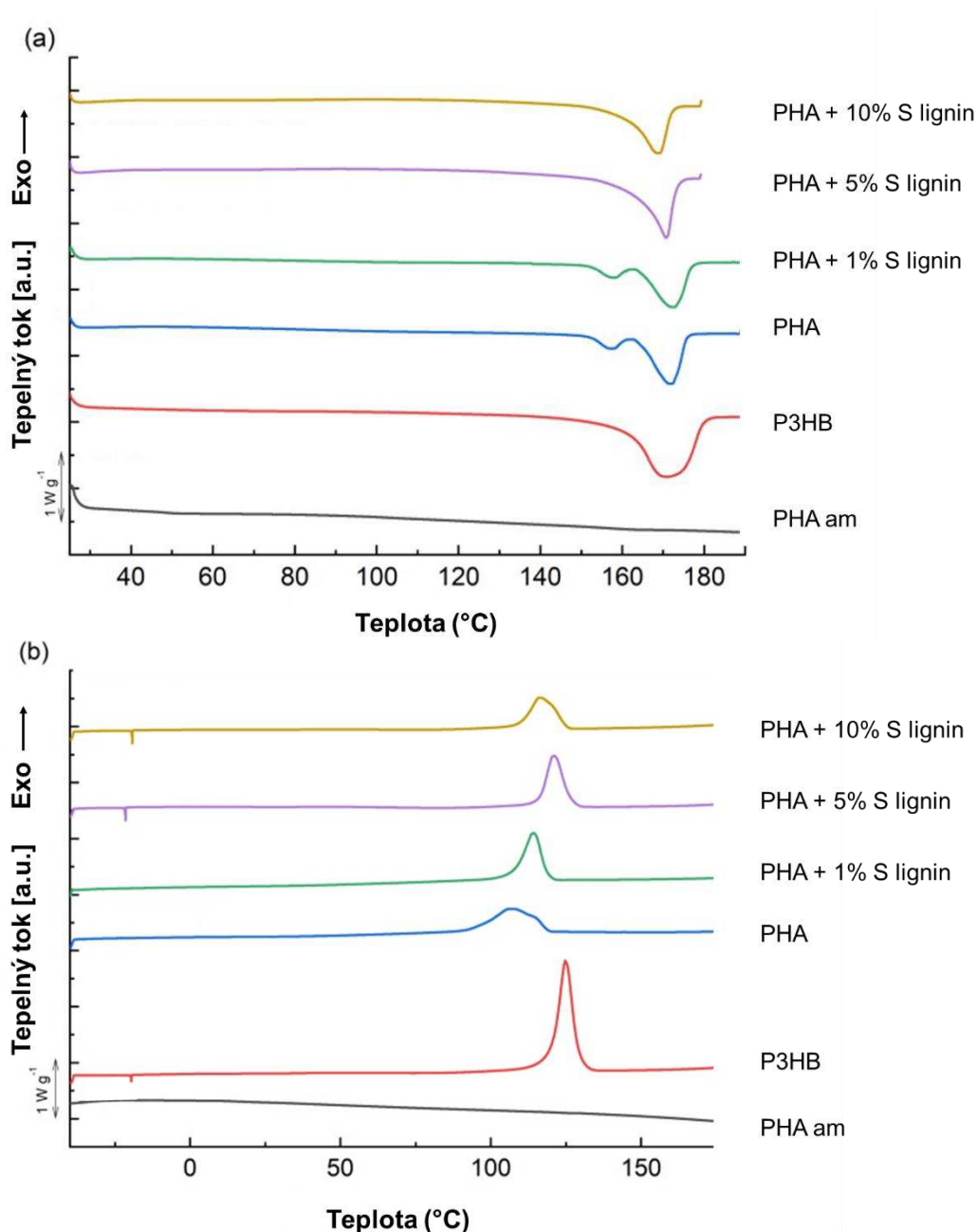
Tímto testem byla potvrzena antioxidační aktivita připravených polymerních filmů. Lignin zháší volné radikály a snižuje intenzitu zabarvení modrozeleného roztoku obsahujícího radikál ABTS<sup>•+</sup>. Měřením byly charakterizovány filmy připravené ze směsi P3HB a amorfního PHA v poměru 1:1 a v porovnání k nim vzorky s ligninem a acetylovaným ligninem izolované z hroznových semen vždy s obsahem 1, 5 a 10 hmotnostních procent (Obrázek 16). Velikost měřených vzorků byla postupně snižována z 10 cm<sup>2</sup> až na 0,5 cm<sup>2</sup>. Z výsledků vyplývá, že antioxidační aktivita je závislá na dávce použitého ligninu. Po 60 minutách největší vzorky deaktivovaly přibližně 70 % volných radikálů. U nejmenších vzorků, tj. 0,5 cm<sup>2</sup>, byla naměřena u vzorků s 5 % ligninu přibližně trojnásobná antioxidační aktivita v porovnání se vzorky obsahujícími jen 1 % ligninu, a to jak u vzorků které obsahovaly soda lignin, tak u vzorků s acetylovaným ligninem. Z porovnání stejně velkých vzorků, které obsahovaly soda lignin a acetylovaný lignin, je jasné patrné, že vzorky obsahující acetylovaný lignin vykazovaly násobně nižší antioxidační aktivitu. Tento výsledek byl v souladu s očekáváním, jelikož při acetylaci ligninu dochází k nahrazování hydroxylových skupin skupinami acetylovými. Tedy klesá počet hydroxylových skupin na aromatických jádrech, které jsou nosiči antioxidačních vlastností.



**Obrázek 16** Porovnání antioxidační aktivity u polymerních filmů ze směsi PHA. Polymerní směs tvořily P3HB a amorfní PHA v poměru 1:1. S% vyjadřuje podíl deaktivovaných radikálů ABTS<sup>•+</sup> vyjádřený v procentech. S lignin – soda lignin, A lignin – acetylovaný lignin

#### 4.6. Diferenční skenovací kalorimetrie

Tepelné vlastnosti směsných PHA filmů byly analyzovány neizotermickou diferenční skenovací kalorimetrií v dusíkové atmosféře. Naměřená data shrnuje tabulka 11, záznamy prvního zahřívacího a ochlazovacího cyklu jsou zobrazeny na obrázku 17, kde jsou porovnány termogramy čistých polymerních filmů a filmů s přídavkem ligninu.



**Obrázek 17 DSC analýza polymerních filmů z P3HB a směsí PHA.** Na obrázku a) je zobrazen 1. zahřívací cyklus a na obrázku b) je zobrazen ochlazovací cyklus. PHA am – amorfní PHA, PHA – směs P3HB a amorfní PHA v poměru 1:1, S lignin – soda lignin

Během prvního zahřívacího cyklu vykázal P3HB široký pík tání při 170 °C a hodnotu entalpie  $87,1 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ , následně během ochlazovacího cyklu zpět krystalizoval při 124 °C. Smíchání krystalického P3HB a amorfního PHA změnilo krystalizační chování získaného polymeru. Směsnému polymeru náleží dvojitý pík během tání při 157,7 °C a 171,8 °C, což poukazuje na přítomnost krystalů s různou morfologií [99]. Hodnota entalpie tání směsného polymeru byla téměř o polovinu nižší než u čistého P3HB. Dále byl u polymerní směsi zaznamenán výrazně širší krystalizační pík, čemuž odpovídá o 17 °C nižší teplota krystalizace ( $T_c$ ) v porovnání s čistým P3HB.



Přídavek ligninu k polymerní směsi PHA zvýšil hodnotu  $T_c$ , z čehož vyplývá, že lignin urychlil krystalizaci polymeru. U vzorků obsahujících 1 % respektive 5 % ligninu vzrostla hodnota  $T_c$  o 8 a 14,8 °C a proces krystalizace byl charakterizován ostrými píky. Nárůst obsahu ligninu v polymerní směsi na 10% koncentraci nevedl k dalšímu zlepšení kinetiky krystalizace. Mimoto absence dvojitého píku během procesu tání u vzorku, který obsahoval 5 % ligninu svědčí o tom, že lignin účinně působil jako nukleační činidlo.

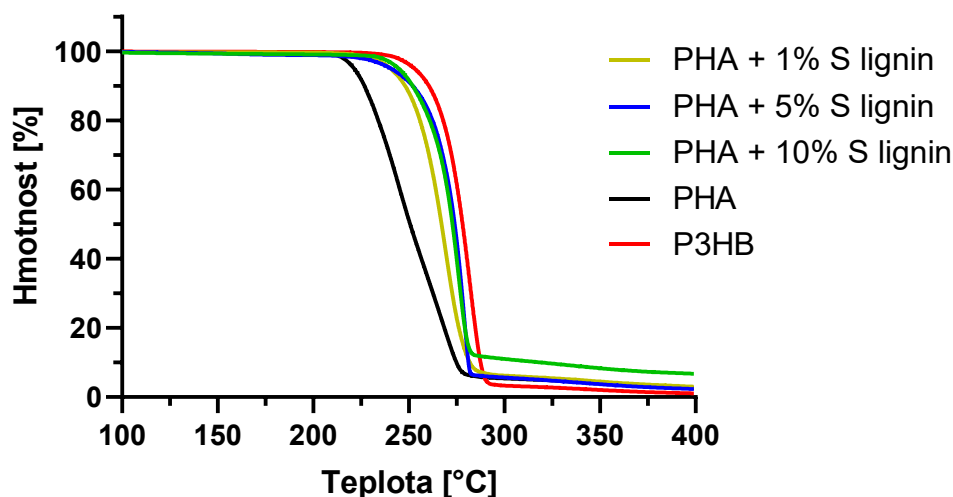
**Tabulka 11 Výsledky DSC analýzy filmů z P3HB směsi P3HB a amorfního PHA.**

Vzorek	1. zahřívací cyklus		Ochlazovací cyklus	
	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J·g <sup>-1</sup> )	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J·g <sup>-1</sup> )
P3HB	170,5	87,1	124	80,3
PHA	157,7/171,8	45,5	106,4	42
PHA + 1 % S lignin	157,6/172,2	46	114,4	41,2
PHA + 5 % S lignin	170,7	48	121,2	41,7
PHA + 10 % S lignin	168,6	41	116,3	35,8

$T_m$  – teplota tání,  $H_m$  – entalpie tání,  $T_c$  – teplota krystalizace,  $H_c$  – entalpie krystalizace, PHA – směs P3HB a PHA

#### 4.7. Termogravimetrická analýza

Tepelná stabilita polymerních filmů byla hodnocena provedením termogravimetrické analýzy. Na obrázku 18 jsou zobrazeny termogramy vzorků PHA měřených ve vzduchové atmosféře s rychlostí zahřívání 10 °C·min<sup>-1</sup>. Termogravimetrická analýza byla provedena u vzorků z čistého P3HB, směsi P3HB a amorfního PHA a směsi PHA s přidaným ligninem z hroznových zrníček.



**Obrázek 18 Termogravimetrická analýza polymerních filmů z P3HB a směsi PHA.** PHA – směs P3HB a amorfní PHA v poměru 1:1, S lignin – soda lignin

Z naměřených dat vyplývá, že vzorky připravené ze směsi P3HB a amorfního PHA byly méně tepelně stabilní v porovnání se vzorky z čistého P3HB. Přidání ligninu ke směsi PHA zlepšilo tepelnou stabilitu polymerů. Teplota počátku degradace ( $T_{onset}$ ) u P3HB byla 244 °C, tedy o 28 °C vyšší než u směsi PHA (Tabulka 12). Přidáním ligninu ke směsi PHA došlo

k posunu počátku tepelné degradace o 15 až 20 °C. Pozitivní efekt na teplotní stabilitu přinesla aplikace ligninu i v případě sledování teploty, při které dochází k maximální degradaci ( $T_{\max}$ ). Vzorky obsahující lignin měly o 24 až 32 °C vyšší  $T_{\max}$  a v případě vzorku, který obsahoval 5 % ligninu se  $T_{\max}$  blížila k hodnotě pro P3HB (281,5 °C). Zbytková hmotnost ( $m_{\text{rest}}$ ) rostla v závislosti na obsahu ligninu, protože lignin obsahuje minerální látky, které byly součástí reziduí.

**Tabulka 12** Výsledky TGA vzorků P3HB a směsi P3HB a amorfního PHA. Analýza proběhla ve vzduchové atmosféře s rychlostí zahřívání 10 °C·min<sup>-1</sup>.

Vzorek	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$T_{\max}$ (°C)	$m_{\text{rest}}$ při 400 °C (%)
P3HB	244,0	281,5	1,0
PHA	215,5	245,1	2,5
PHA + 1 % S lignin	230,6	269,1	3,0
PHA + 5 % S lignin	224,8	277,3	2,9
PHA + 10 % S lignin	235,7	275,3	6,7

$T_{\text{onset}}$  – začátek degradace,  $T_{\max}$  – teplota, při které dochází k největšímu poklesu hmotnosti vzorku,  $m_{\text{rest}}$  – zbytková hmotnost vzorku po spálení při 400 °C

#### 4.8. Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti byly hodnoceny u dvou skupin vzorků, jednalo se o filmy připravené z čistého P3HB a ze směsi P3HB a amorfního PHA v poměru 1:1. Polymery byly modifikovány přidáním ligninu jako plniva. Použitý lignin byl izolovaný z hroznových semen a k oběma typům polymerů byl přidán jak soda lignin, tak jeho acetylovaná forma. Vzorky byly připraveny s obsahem 1, 5 a 10 hmotnostních procent ligninu pro každou variantu. Mechanické vlastnosti připravených vzorků byly charakterizovány měřením Youngova modulu, pevnosti v tahu  $\sigma_B$  a délkového prodloužení při přetržení  $\varepsilon_B$ . Měření bylo provedeno třikrát, tabulky 13 a 14 shrnují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky.

**Tabulka 13 Mechanické vlastnosti P3HB filmů s ligninem.**

Vzorek	Youngův modul (MPa)	Pevnost v tahu $s_B$ (MPa)	Délkové prodloužení při přetržení $\varepsilon_B$ (%)
P3HB	2050 ± 220	49,2 ± 3,5	8,4 ± 1,6
P3HB + 1 % S lignin	2070 ± 120	41,5 ± 3,0	6,6 ± 2,0
P3HB + 5 % S lignin	1540 ± 230	36,1 ± 5,0	9,7 ± 3,3
P3HB + 10 % S lignin	1820 ± 130	39,7 ± 6,0	8,7 ± 4,2
P3HB + 1 % A lignin	1524 ± 140	41,1 ± 2,0	9,0 ± 3,3
P3HB + 5 % A lignin	1340 ± 60	40,0 ± 3,0	8,5 ± 1,1
P3HB + 10 % A lignin	1240 ± 20	30,9 ± 1,5	5,1 ± 0,5

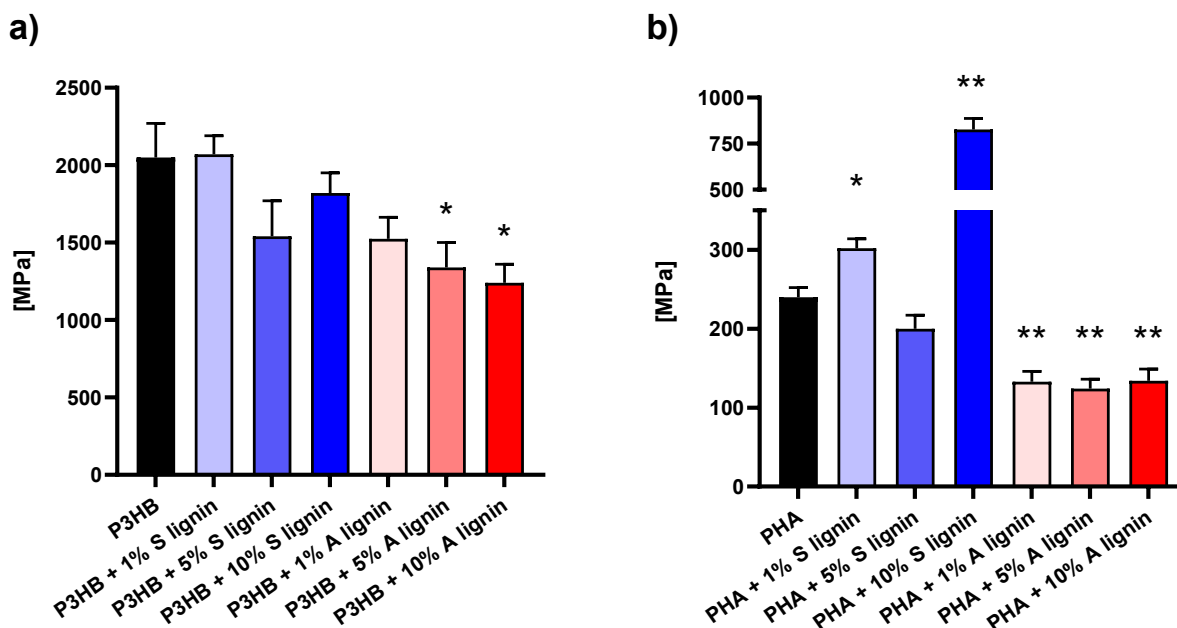
S lignin – soda lignin, A lignin – acetylovaný lignin

**Tabulka 14 Mechanické vlastnosti filmů ze směsi P3HB a amorfního PHA s ligninem.**

Vzorek	Youngův modul (MPa)	Pevnost v tahu $s_B$ (MPa)	Délkové prodloužení při přetržení $\varepsilon_B$ (%)
PHA	240 ± 12	6,6 ± 0,5	95 ± 12
PHA + 1 % S lignin	302 ± 12	29,0 ± 0,8	68 ± 20
PHA + 5 % S lignin	200 ± 17	36,0 ± 3,0	82 ± 30
PHA + 10 % S lignin	827 ± 60	13,0 ± 2,0	15 ± 4
PHA+ 1 % A lignin	133 ± 13	4,0 ± 0,8	74 ± 18
PHA+ 5 % A lignin	124 ± 12	3,1 ± 0,3	69 ± 20
PHA+10 % A lignin	134 ± 15	3,0 ± 0,2	43 ± 5

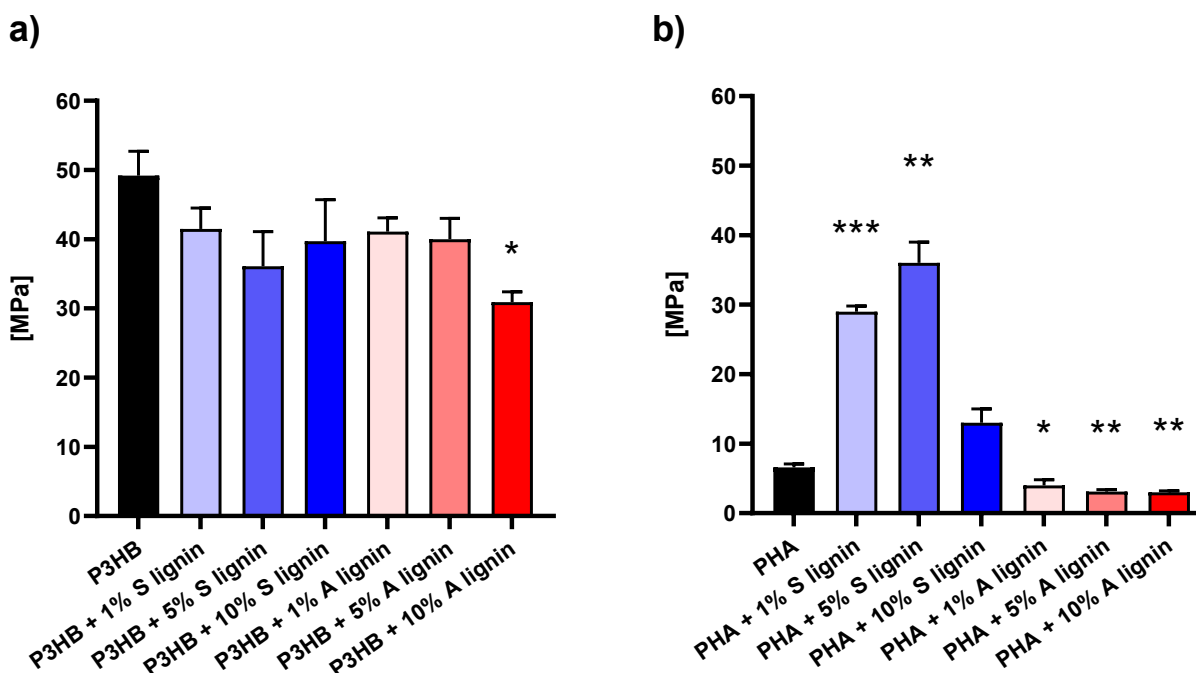
S lignin – soda lignin, A lignin – acetylovaný lignin, PHA – směs P3HB a amorfní PHA v poměru 1:1

Youngův modul neboli modul pružnosti je důležitá charakteristika polymeru vyjadřující jeho houževnatost. Houževnatost je schopnost materiálu zůstat při ohýbání a nárazech vcelku, bez tvorby trhlin [10]. Průměrná naměřená hodnota Youngova modulu pro P3HB byla 2050 ± 220 MPa (Obrázek 19). Z výsledků je patrné, že aplikace ligninu, ať už soda ligninu nebo jeho acetylované formy, nemělo pozitivní vliv na P3HB a v případě přídavku 5 a 10 % acetylovaného ligninu došlo k signifikantnímu poklesu Youngova modulu. Ve srovnání s čistým P3HB dosáhla hodnota směsi P3HB s amorfním PHA pouze 240 ± 12 MPa, tedy řádově nižší hodnoty. Využití soda ligninu jako plniva pro směs P3HB s amorfním PHA významně zvýšilo hodnoty Youngova modulu v případě 1 a 10% obsahu soda ligninu, u vzorku s 5% obsahem soda ligninu nebyl zaznamenán rozdíl. Naopak acetylovaný lignin použitý jako plnivo snížil ve všech obsahových variantách hodnoty Youngova modulu u směsného polymeru.



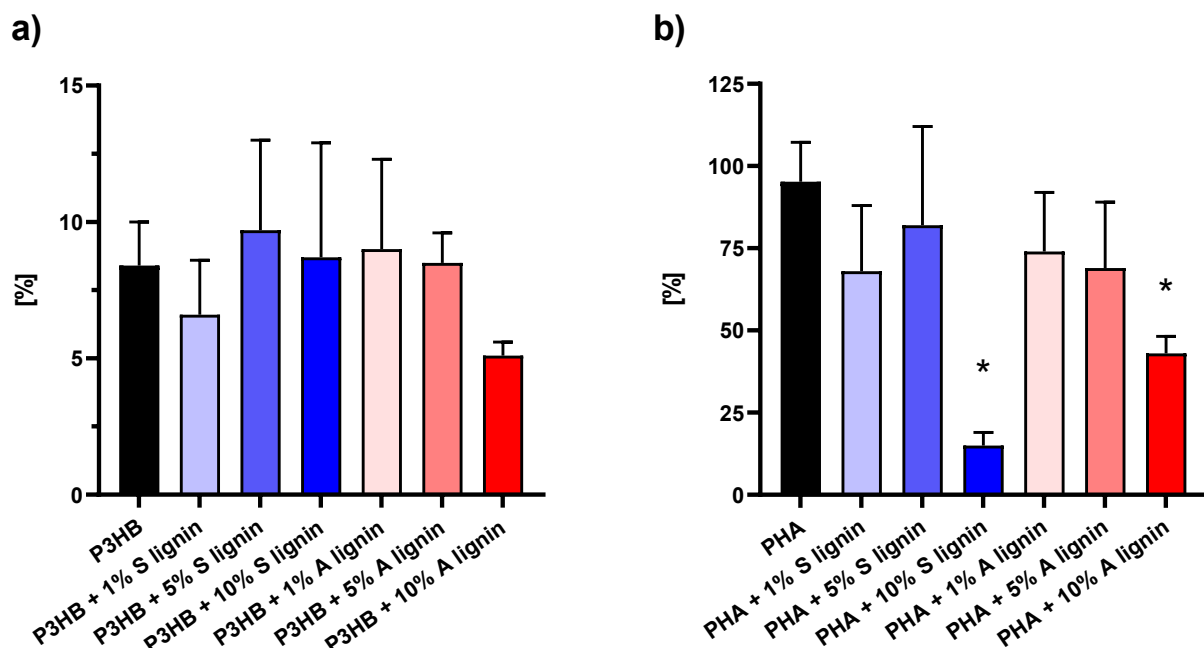
**Obrázek 19** Porovnání průměrných hodnot a směrodatných odchylek Youngova modulu pro polymerní filmy. Na grafu a) jsou vyneseny hodnoty Youngova modulu pro P3HB a jeho směsi se soda a acetylovaným ligninem. Hodnoty vzorků, které obsahovaly soda lignin, se od čistého P3HB významně nelišily. U vzorků s acetylovaným ligninem, s obsahem 5 a 10 % ligninu došlo k signifikantnímu poklesu hodnot. Graf b) zobrazuje Youngův modul pro polymerní směs PHA, kterou tvořilo P3HB s amorfním PHA v poměru 1:1. Lignin jako plnivo měl významný vliv ve všech variantách kromě 5% soda ligninu. Vzorky s 1 % a s 10 % soda ligninem významně zvýšily hodnotu Youngova modulu. Naopak přidání acetylovaného ligninu vedlo ke snížení hodnot. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

Další sledovanou charakteristikou byla mez pevnosti v tahu, zkráceně pevnost v tahu  $\sigma_B$ , která udává maximální možné napětí v materiálu během natahování, při kterém ještě nedojde k přetržení zkušebního tělesa. Průměrná hodnota pevnosti v tahu u čistého P3HB byla  $49,2 \pm 3,5$  MPa a u směsi P3HB s amorfním PHA byla  $6,6 \pm 0,5$  MPa, došlo tedy k jejímu výraznému snížení (Obrázek 20). Přidání ligninu k P3HB nemělo významný efekt, pouze u varianty s 10 % acetylovaného ligninu významně poklesla hodnota pevnosti v tahu. Vzorky připravené ze směsi PHA se soda ligninem měly signifikantně lepší pevnost v tahu než směs bez ligninu, a to konkrétně  $29 \pm 0,8$  MPa u 1 % soda ligninu, respektive  $36 \pm 3$  MPa u 5 % soda ligninu. Obsah soda ligninu 10 % neměl na pevnost v tahu významný vliv. U vzorků obsahujících acetylovaný lignin došlo k významnému poklesu hodnot meze pevnosti v tahu.



**Obrázek 20** Porovnání průměrných hodnot a směrodatných odchylek meze pevnosti v tahu u P3HB filmů na grafu a) a filmů ze směsi P3HB s amorfním PHA na grafu b). Ligninu jako plnivo neměl signifikantní účinek na mez pevnosti u P3HB, pouze acetylovaný lignin v 10% obsahu mez pevnosti významně snížil. Přidání soda ligninu ke směsnému polymeru PHA vedlo ve variantě 1 a 5 % k významnému nárůstu hodnot, ale 10 % soda ligninu nemělo na mez pevnosti významný vliv. Vzorky s acetylovaným ligninem dosáhly významně nižší meze pevnosti v tahu. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Třetí analyzovanou mechanickou vlastností bylo délkové prodloužení při přetržení  $\epsilon_B$ , které vyjadřuje celkovou tažnost polymeru. Průměrná hodnota délkového prodloužení při přetržení byla u P3HB  $8,4 \pm 1,6$  % a u směsi P3HB s amorfním PHA  $95 \pm 12$  % (Obrázek 21). Vliv soda ligninu ani acetylovaného ligninu na P3HB filmy nebyl statisticky významný. Podobně přídavek ligninu ke směsi P3HB s amorfním PHA neměl významný vliv, pouze v množství 10 % soda ligninu i acetylovaného došlo k významnému snížení hodnoty délkového prodloužení při přetržení.



**Obrázek 21 Porovnání průměrných hodnot a směrodatných odchylek délkového prodloužení při přetržení  $\epsilon_B$ .** Na grafu a) jsou vyneseny hodnoty délkového prodloužení při přetržení pro filmy z P3HB. Aplikace ligninu jako plniva pro filmy z P3HB neměla významný vliv. Na grafu b) jsou hodnoty pro filmy ze směsi P3HB s amorfním PHA, podobně jako u P3HB nemělo přidání ligninu významný vliv, pouze u vzorků s obsahem 10 % ligninu, a to jak soda ligninu tak i acetylovaného ligninu, došlo k významnému poklesu hodnoty délkového prodloužení při přetržení. \*  $p < 0,05$

## 5. DISKUZE

V rámci této diplomové práce byla optimalizována metoda izolace soda ligninu z hroznových výlisků. Podařilo se dosáhnout výtěžnosti 9,5 % u izolace ligninu z hroznových semínek, respektive 25,4 % u hroznových slupek. Vzhledem k celkovému obsahu ligninu v hroznových semíncích, který byl v literatuře publikován kolem 41–43 % [191, 204, 205], není výtěžnost příliš vysoká a je prostor pro její zlepšení. Zvolenou metodou byl ovšem získán lignin, který nebyl kontaminován sírou a byl také částečně rozpustný v chloroformu, a proto mohl být úspěšně použit jako plnivo pro přípravu PHA filmů. Za účelem zvýšení rozpustnosti byl lignin acetylován, čímž bylo dosaženo úplné rozpustnosti.

Lignin byl charakterizován stanovením prvkového složení, které se může lišit dle způsobu izolace ligninu a použité suroviny. Zastoupení uhlíku v ligninu je nejčastěji v literatuře uváděno v rozmezí 60 až 63 % [105, 190, 197, 206], tomuto rozmezí odpovídají naměřené hodnoty u mnou izolovaných vzorků. V případě ligninů, které obsahují síru, může dojít k ovlivnění procentuálního zastoupení prvků, a proto je nutné zohlednit přítomnost síry při porovnávání obsahu ostatních prvků. Obsah vodíku byl ve vzorcích ligninu vyšší než jsou publikované hodnoty, které se pohybují mezi 5 až 6 % [190, 197, 206]. V případě ligninu izolovaného z hroznových slupek byl obsah vodíku dvojnásobný, což společně s přibližně 3% obsahem dusíku naznačuje přítomnosti jiných sloučenin, jako jsou proteiny nebo sacharidy [190]. V souvislosti s vysokým zastoupením vodíku byl obsah kyslíku nižší (Tabulka 9), jelikož se jeho hodnota dopočítává po odečtení ostatních prvků a minerálních látek. V literatuře je uváděn obsah kyslíku mezi 30 a 33 % [190, 197].

Stanovení obsahu minerálních látek bylo provedeno analýzou obsahu popela. Dostupné údaje v literatuře uvádí obsah popela v rozmezí 0,5–8 % [166, 207–209]. Vyšší zastoupení minerálních látek svědčí o nižší čistotě ligninu a také je ovlivněno způsobem izolace ligninu. Mnou izolované vzorky soda ligninů obsahovaly množství popela ve zmíněném rozsahu, přičemž soda lignin z hroznových semínek měl obsah popela u horní hranice tohoto rozmezí. Modifikace ligninu acetylací významně snížila přítomnost minerálních látek v ligninu.

Dále byl lignin charakterizován naměřením FTIR spekter, na kterých byly popsány pásy charakteristické pro lignin. Metoda FTIR byla provedena za účelem ověření úspěšnosti acetylce ligninových vzorků. Z naměřených spekter je patrné, že tato modifikace byla úspěšná, o čemž svědčí i lepší rozpustnost acetylovaného ligninu v chloroformu.

Izolovaný lignin byl použit jako aditivum za účelem zlepšení vlastností PHA filmů. Lignin je přirozený antioxidant a tuto vlastnost je možné využít při přípravě polymerních materiálů. Antioxidační aktivita ligninu se může výrazně lišit v závislosti na typu použitého ligninu [210]. Antioxidační aktivita ligninu není pravděpodobně lineárně závislá na počtu hydroxylových skupin navázaných na aromatickém jádře, ale je ovlivněna i faktory, které souvisí se strukturou ligninu, jako je sterická dostupnost hydroxylových skupin nebo stabilizace fenoxylových radikálů.

Přídavek ligninu k PHA filmům zajistil antioxidační vlastnosti výsledného směsného polymeru. Antioxidační aktivita byla prokázána metodou zhášení radikálu ABTS<sup>•+</sup>. Vysoká antioxidační aktivita ligninu se projevila i po smíchání ligninu s PHA. Dosažené výsledky byly

v souladu, s již dříve publikovanými studiemi. Přidávání ligninu do různých polymerů, pro zvýšení jejich antioxidační aktivity, je předmětem výzkumu v oblasti funkčních materiálů. Obvykle lignin tvoří maximálně 20 % výsledného materiálu.

Například přidání ligninu z pšeničné slámy výrazně zvýšilo antioxidační aktivitu škrobových filmů [207] a PLA filmů [175], dále bylo popsáno zlepšení antioxidační aktivity u želatinových filmů po přidání ligninu [211]. Z celulózových nanovláken byly připraveny membránové filtry, které měly po přidání ligninu antioxidační vlastnosti a umožňovaly deaktivaci radikálů během filtrace [212]. U filmů připravených ze směsi PVA, chitosanu a ligninu, který byl izolován z trstí rákosovité, přidání ligninu výrazně zvýšilo antioxidační aktivitu, přičemž již samotný chitosan má antioxidační vlastnosti [181]. Kromě filmů byl lignin využit i při přípravě vláken s antioxidační aktivitou pomocí elektrospiningu. Byla připravena vlákna z ligninu roubovaného na P3HB, u kterých byla v závislosti na množství přidaného ligninu popsána významná antioxidační aktivita [100]. Polymerní vlákna se silnými antioxidačními vlastnosti byla zhotovena také z PCL s ligninem [213].

Ve studii, která se zabývala přípravou antioxidačních filmů z ethylcelulózy použili jako zdroj antioxidačních vlastností tanin izolovaný z hroznových semínek a byla použita stejná metoda měření antioxidační aktivity jako v této diplomové práci, což umožňuje porovnání připravených materiálů [188]. Na základě srovnání naměřených hodnot je patrné, že použitím taninu bylo dosaženo výrazně nižší antioxidační kapacity v porovnání s ligninem z hroznových semínek.

Pro polymerní materiály, které jsou určeny jako potravinové obaly, jsou dobré bariérové vlastnosti pro plyny velmi důležité. Chrání potraviny před vlhkostí a brání přístupu kyslíku, což zlepšuje jejich udržitelnost [214]. Většina biodegradabilních materiálů zkoumaných jako obalový materiál je hydrofilní, proto jejich bariérové vlastnosti kolísají dle vlhkosti. PHA jsou hydrofobní, tudíž změna vlhkosti neovlivňuje jejich vlastnosti, a z tohoto důvodu jsou vhodné pro balení potravin.

Pro zesílení bariérových vlastností biodegradabilních polymerů byla testována různá plniva. Často aplikovaným plnivem byly anorganické jíly nebo celulózové nanokrystaly [215–217]. Využitím těchto plniv došlo ke zlepšením bariérových vlastností o desítky procent. V případě ligninu byla rovněž hodnocena jeho schopnost snížit propustnost polymerních materiálů. Aplikací 10 % ligninu došlo k poklesu propustnosti pro kyslík u PLA o 25 % z 2,0 na  $1,5 \frac{\text{cm}^3 \cdot \text{cm}}{\text{m}^2 \cdot 24 \text{hod} \cdot 0,1 \text{MPa}}$  [175]. Dále bylo publikováno, že u P3HB-3HV poklesla propustnost při použití 10 % ligninu pro kyslík o 88 % na  $0,2 \frac{\text{cm}^3 \cdot \text{cm}}{\text{m}^2 \cdot 24 \text{hod} \cdot 0,1 \text{MPa}}$  a pro CO<sub>2</sub> o 98 % na  $0,3 \frac{\text{cm}^3 \cdot \text{cm}}{\text{m}^2 \cdot 24 \text{hod} \cdot 0,1 \text{MPa}}$  [218]. Tyto hodnoty jsou na úrovni propustnosti udávané pro P3HB, který má lepší bariérové vlastnosti než P3HB-3HV [17].

Námi naměřený koeficient propustnosti kyslíku pro směsné PHA filmy s ligninem byl v rozmezí 0,06–0,08  $\frac{\text{cm}^3 \cdot \text{cm}}{\text{m}^2 \cdot 24 \text{hod} \cdot 0,1 \text{MPa}}$ , tyto hodnoty se pohybují na úrovni propustnosti polyamidu a jsou o řád nižší než propustnost PET. Avšak vynikající bariérové polymery jako PAN, PVDC nebo EVOH vykazují hodnoty propustnosti ještě o řád nižší než naměřená data (Tabulka 2).



Propustnost připravených filmů pro CO<sub>2</sub> se lišila v závislosti na použitém množství ligninu, vzorek obsahující 10 % ligninu měl asi o 80 % nižší propustnost než vzorek s 1 % ligninu. Zaznamenaný pokles propustnosti odpovídá rozdílu hodnot propustnosti P3HB-3HV filmů se stejným množstvím ligninu jako námi měřené vzorky [218]. Námi naměřené hodnoty propustnosti pro CO<sub>2</sub> byly obdobně jako u propustnosti pro O<sub>2</sub> nižší než u PET, ale vyšší než PAN, PVDC nebo EVOH. V případě propustnosti pro N<sub>2</sub> se hodnoty mezi filmy s různým obsahem ligninu výrazně nelišily a byly vyšší než propustnost PET, ale nižší než HD-PE.

Tepelné vlastnosti polymerních filmů byly charakterizovány pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie a termogravimetrie. Amorfni PHA použitý na přípravu filmů nemůže tát nebo krystalizovat, protože se jedná o amorfni polymer s teplotou skelného přechodu -26,7 °C. Metodou DSC je obtížné měřit teplotu skelného přechodu P3HB z důvodu jeho vysoké krystalinity a nízké hodnoty změny tepelné kapacity skelného přechodu, kterou není možné pomocí DSC zaznamenat [106, 203]. Z výsledků DSC je patrné, že během procesu tání směs P3HB a amorfniho PHA vykázala dvojitý pík, který dokládá, že došlo k homogenní a heterogenní nukleaci [93, 99, 219]. Naopak vzorkům, který obsahovaly 5 a 10 % ligninu, náležel pouze jednoduchý pík pro proces tání. Tento výsledek naznačuje, že přítomný lignin způsobil zlepšení interakce mezi P3HB a amorfni PHA.

Dále lignin přítomný ve směsném polymeru zřejmě působil jako nukleační činidlo, protože krystalizace polymerní směsi proběhla při vyšší teplotě, a tedy proces krystalizace byl rychlejší. Tento posun teploty krystalizace způsobené přidáním ligninu byl popsán v řadě dalších studií [99, 102, 220–222].

Tepelná stabilita polymerních směsí byla testována pomocí termogravimetrie. Směs P3HB a amorfniho PHA měla výrazně nižší hodnotu  $T_{\text{onset}}$  a také  $T_{\text{max}}$  v porovnání s čistým P3HB. Přidání ligninu ke směsnému polymeru PHA v závislosti na dávce se obě tyto teploty degradace přiblížily k hodnotám P3HB. Z těchto výsledků je jednoznačně patrné, že lignin zvýšil tepelnou stabilitu připravených polymerů. Údaje dostupné v literatuře o vlivu ligninu na tepelnou stabilitu PHA jsou nejednoznačné. Například lignin přidávaný k vláknům P3HB posunul počátek degradace polymeru až do 10% obsahu ligninu, nebyl ale pozorován účinek v závislosti na dávce, naopak nejvyšší tepelné stability bylo dosaženo při přidání nejmenšího obsahu ligninu tj. 1 % [100]. V souladu s našimi výsledky kraft lignin smíchaný s P3HB-3HV mírně zvýšil  $T_{\text{onset}}$  a výrazněji zvýšil  $T_{\text{max}}$  v závislosti na obsahu ligninu [218].

Studie, která zkoumala vlastnosti materiálu připraveného roubováním P3HB-3HV na lignin, ukázala, že vliv ligninu na tepelnou stabilitu závisí na podmínkách a postupu přípravy roubovaného polymeru [99]. Bylo zaznamenáno navýšení i pokles tepelné stability u různě připravených roubovaných polymerů. V této studii byl dále hodnocen vliv ligninu na tepelnou stabilitu fyzikálních směsí, ve kterých lignin snížil tepelnou stabilitu, což je v přímém rozporu s naměřenými hodnotami u mnou připravených vzorků. Ke stejným závěrům dospěla také práce [105].

U směsí P3HB, respektive P3HB-3HV, které obsahovaly větší procentuální množství ligninu došlo ke snížení teploty začátku degradace a degradace neprobíhá v jednom ostrém kroku, ale postupně ve větším rozsahu teplot [102, 104]. Obdobně jako tepelná degradace čistého ligninu, což je zřejmě způsobeno jeho složitou heterogenní strukturou. Nižší  $T_{\text{onset}}$  mohl být způsoben

přítomností hemicelulóz v ligninu [106]. Z provedených analýz je patrné, že použití ligninu jako plniva pro směsný polymer mělo pozitivní účinek na jeho tepelné vlastnosti.

Slabé mechanické vlastnosti, především křehkost omezují využití P3BH. Za účelem zlepšení mechanických vlastností byl v této práci použit lignin jako plnivo. Testováním filmů z P3HB a ligninu z hroznových semínek se tento předpoklad nepotvrdil. Přidání soda ligninu i jeho acetylované formy nezlepšilo mechanické vlastnosti P3HB filmů. Proto byla zvolena jiná strategie, jak zlepšit mechanické vlastnosti P3HB, a to příprava směsného polymeru z krystalického P3HB s amorfním PHA. Vzniklý polymer vykázal desetinásobně lepší délkové prodloužení při přetržení, ale Youngův modul a pevnost v tahu se výrazně snížily. Směsný polymer byl dále modifikován ligninem, přičemž přídavek především 1 % soda ligninu měl výrazně pozitivní vliv na mechanické vlastnosti polymerních filmů. Došlo ke zvýšení Youngova modulu o 25 % a pevnosti v tahu více než 4krát. Délkové prodloužení při přetržení sice pokleslo, ale stále bylo 8krát vyšší než u čistého P3HB. Acetylovaný lignin se jako plnivo pro připravené polymerní filmy neosvědčil.

Přidání ligninu k PHA vedlo dle dostupných studií jednoznačně ke zvýšení Youngova modulu. V případě modifikace pevnosti v tahu nejsou výsledky studií jednoznačné. Pevnost v tahu byla zlepšena přidáním ligninu k P3HB pouze v případě přípravy vláken pomocí elektrospiningu [100, 223]. V dalších studiích, které se zabývaly modifikací filmů z P3HB, respektive P3HB-3HV, nebyla pevnost v tahu ligninem ovlivněna [218, 224] případně došlo dokonce k jejímu zhoršení [99, 101]. Třetím sledovaným parametrem bylo délkové prodloužení při přetržení. Stejně jako v případě pevnosti v tahu lignin zlepšil délkové prodloužení při přetržení pouze u vláken z P3HB [100, 223], u filmů z P3HB-3HV došlo ke zhoršení tažnosti [99, 217], což odpovídá výsledkům v této práci. Pokles celkové tažnosti mohl být způsoben rigidní strukturou ligninu, který nelze považovat za vhodné změkčovadlo [218].

## 6. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala izolací ligninu z hroznových semínek a jeho aplikací jako plniva pro PHA filmy. Připravené polymerní filmy mají potenciál ve využití jako funkční, kompostovatelný materiál z obnovitelných zdrojů pro balení potravin. V současné době se potraviny balí převážně do konvenčních plastů vyrobených z ropy, které ale neudržitelně zatěžují životní prostředí, a to jak při získávání surovin pro jejich výrobu, tak po skončení jejich životnosti. Pro vylepšení vlastností PHA filmů byl použit lignin izolovaný z hroznových semínek, které jsou produkovány jako odpadní materiál při výrobě vína. Byl tedy využit odpad z potravinářského průmyslu jako surovina pro další zpracování.

Experimentální část práce byla tvořena dvěma skupinami cílů. V první části byla vybrána a ověřena vhodná metoda izolace ligninu, který byl následně úspěšně použit jako plnivo pro PHA filmy. Pro zlepšení možností využití ligninu jako plniva byl lignin následně modifikován pomocí acetylce. Získaný soda lignin i jeho acetylovaná forma byly charakterizovány stanovením prvkového složení a obsahu minerálních látek, které odpovídaly již dříve publikovaným hodnotám. Dále byla u ligninových vzorků změřena FTIR spektra, která potvrdila úspěšnost modifikace ligninu acetylací díky přítomnosti specifických píků.

Druhá část byla věnována zlepšení vlastností P3HB filmů, které kvůli vysokému stupni krystalinity vykazují slabé mechanické vlastnosti, což brání jejich širšímu využití. Lignin byl použit jako aditivum pro P3HB filmy za účelem zlepšení termálních a mechanických vlastností a zvýšení jejich antioxidační stability. Přídavek soda ligninu izolovaného z hroznových semínek ani jeho acetylované formy nevedl ke zlepšení mechanických vlastností. Proto byla dále připravena polymerní směs z P3HB a amorfního PHA v poměru 1:1. Výsledný směsný polymer byl výrazně elastičtější, stanovení mechanických vlastností prokázalo významně lepší délkové prodloužení při přetržení, ale současně se Youngův modul i pevnost v tahu snížily. Vlastnosti směsného PHA polymeru byly dále upraveny přidáním ligninu. Youngův modul a pevnost v tahu byly signifikantně zlepšeny, zatímco délkové prodloužení při přetržení nebylo statisticky významně ovlivněno. Nejlepší mechanické vlastnosti vykazaly vzorky směsného polymeru s 1 a 5 % soda ligninu. Bylo také analyzováno použití acetylované formy ligninu z hroznových semínek, ale jejich aplikací nedošlo ke zlepšení mechanických vlastností.

Kromě mechanických vlastností byly zkoumány termální vlastnosti polymerů pomocí DSC a TGA. Z analýzy tání a krystalizace je patrné, že lignin přítomný v polymerní směsi P3HB a amorfního PHA působil jako nukleační činidlo, jelikož jeho přídavek způsobil zvýšení teploty krystalizace a odstranění dvojitého píku při procesu tání. Z analýzy tepelné stability vyplývá, že lignin jednoznačně zvýšil tepelnou stabilitu směsného polymeru. V závislosti na dávce použitého ligninu došlo ke zvýšení teploty počátku tepelné degradace i teploty maximální degradace.

Jelikož připravený polymerní materiál byl určený jako aktivní obal pro potraviny, byly dále hodnoceny antioxidační vlastnosti a propustnost pro plyny, které představují důležitá kritéria pro aktivní obalové materiály. Lignin, díky svým antioxidačním vlastnostem, dodal přidanou hodnotu do PHA filmů. Antioxidační vlastnosti PHA filmů s ligninem byly ověřeny ABTS testem, který potvrdil jejich významnou antioxidační aktivitu, která se zvyšovala podle množství přidaného ligninu. Bariérové vlastnosti připravených polymerních filmů byly

hodnoceny měřením propustnosti plynů. P3HB disponuje velice dobrými bariérovými vlastnostmi a připravené filmy ze směsi PHA s ligninem měly nižší propustnost než P3HB nebo některé polymery běžně používané k balení potravin.

## 7. LITERATURA

- [1] ROBERTSON, Gordon. *Food Packaging: Principles and Practice*. Third Edit. Boca Raton: CRC Press, 2013. ISBN 9781439862414.
- [2] DOBIÁŠ, Jaroslav a Dušan ČURDA. *Balení potravin - sylaby textů k přednáškám* [online]. 2004. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/ktk/wwwroot/staff/dobias/baleni.pdf>
- [3] SMEJTKOVÁ, Andrea. *Balení v potravinářském průmyslu*. B.m.: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2018. ISBN 978 – 80 – 213 – 2864 - 8.
- [4] GUSTAVSSON, Jenny, Christel CEDERBERG, Ulf SONESSON, Robert van OTTERDIJK a Alexandre MEYBECK. *Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*. 2011. ISBN 9781788975391.
- [5] KAČEŇÁK, Igor. *Obaly a obalová technika*. Bratislava: Slovenská vysoká škola technická v Bratislavě, 1990. ISBN 80-227-0301-X.
- [6] ŠTENCL, Jiří. *Balení potravin* [online]. Brno: VFU Brno, 2013. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/13-BP\\_e-opora2.pdf](https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/13-BP_e-opora2.pdf)
- [7] GLOBENEWSWIRE. Food packaging market value forecast worldwide from 2018 to 2025 (in billion U.S. dollars). *Statista Inc.* [online]. 2019 [vid. 2020-02-14]. Dostupné z: <https://www.statista.com/statistics/876489/food-packaging-market-value-forecast-worldwide/>
- [8] TECK KIM, Young, Byungjin MIN a Kyung WON KIM. General Characteristics of Packaging Materials for Food System. In: *Innovations in Food Packaging* [online]. B.m.: Elsevier, 2014, s. 13–35. ISBN 9780123946010. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394601-0.00002-3
- [9] *Commission Directive 2001/62/EC* [online]. B.m.: Official Journal L 221. 2001. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32001L0062>
- [10] BĚHÁLEK, Luboš. *Polymery* [online]. B.m.: publi.cz, 2016. ISBN 978-80-88058-66-3. Dostupné z: <https://publi.cz/books/180/Uvod.html>
- [11] PAINE, Frank A. *A Handbook of Food Packaging*. Second edi. New Delhi: Chapman & Hali, 1992. ISBN 9781461362142.
- [12] COLES, Leah. *Functional Foods: The Connection Between Nutrition, Health, and Food Science* [online]. London: Blackwell Publishing Ltd, 2003. ISBN 9781482232752. Dostupné z: doi:10.1201/b16307
- [13] ASHLEY, R. J. Permeability and Plastics Packaging. *Polymer Permeability* [online]. 1985, 269–308. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-009-4858-7\_7
- [14] LAOHAKUNJIT, Natta a Athapol NOOMHORM. Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. *Starch/Staerke* [online]. 2004, **56**(8), 348–356. ISSN 00389056. Dostupné z: doi:10.1002/star.200300249
- [15] SOTHORNVIT, R. a J. M. KROCHTA. Plasticizer effect on oxygen permeability of  $\beta$ -lactoglobulin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, **48**(12), 6298–6302. ISSN 00218561. Dostupné z: doi:10.1021/jf000836l
- [16] PIRINGER, O.-G a A. L. BANER. *Plastic Packaging Materials for Food Barrier Function, Mass Transport, Quality Assurance, and Legislation*. New York: Wiley-VCH, 2000. ISBN 3-527-28868-6.
- [17] KESKIN, Gülsah, Gülnur KLZLL, Mikhael BECHELANY, Céline POCHAT-BOHATIER a Mualla ÖNER. Potential of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymers

- family as substitutes of petroleum based polymers for packaging applications and solutions brought by their composites to form barrier materials. *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2017, **89**(12), 1841–1848. ISSN 13653075. Dostupné z: doi:10.1515/pac-2017-0401
- [18] VANDEWIJNGAARDEN, Jens, Marius MURARIU, Philippe DUBOIS, Robert CARLEER, Jan YPERMAN, Jan D'HAEN, Roos PEETERS a Mieke BUNTINX. Effect of ultrafine talc on crystallization and end-use properties of poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyhexanoate). *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2016, **133**(45). ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.43808
- [19] ASHTER, Syed Ali. Lamination. In: *Thermoforming of Single and Multilayer Laminates* [online]. B.m.: Elsevier Inc., 2014, s. 65–81. ISBN 9781455731725. Dostupné z: doi:10.1016/b978-1-4557-3172-5.00004-9
- [20] MORRIS, Barry A. Polymer Blending for Packaging Applications. In: *Multilayer Flexible Packaging: Second Edition* [online]. B.m.: Elsevier Inc., 2016, s. 173–204. ISBN 9780323371001. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-37100-1.00013-2
- [21] MARSH, Kenneth a Betty BUGUSU. Food packaging - Roles, materials, and environmental issues: Scientific status summary. *Journal of Food Science* [online]. 2007, **72**(3). ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x
- [22] GEYER, Roland, Jenna R. JAMBECK a Kara Lavender LAW. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances* [online]. 2017, **3**(7), 25–29. ISSN 23752548. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.1700782
- [23] PLASTICSEUROPE (PEMRG). Production of plastics worldwide from 1950 to 2018. *Statista Inc.* [online]. 2019. Dostupné z: <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>
- [24] EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY. *The plastic waste trade in the circular economy* [online]. Briefing n. 2019. ISBN 978-92-9480-102-9. Dostupné z: doi:10.2800/220248
- [25] BROOKS, Amy L., Shunli WANG a Jenna R. JAMBECK. The Chinese import ban and its impact on global plastic waste trade. *Science Advances* [online]. 2018, **4**(6), 1–8. ISSN 23752548. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.aat0131
- [26] GEUEKE, Birgit, Ksenia GROH a Jane MUNCKE. Food packaging in the circular economy: Overview of chemical safety aspects for commonly used materials. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2018, **193**, 491–505. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2018.05.005
- [27] PIVNENKO, Kostyantyn, Maria Kampmann ERIKSEN, J. A. MARTÍN-FERNÁNDEZ, Eva ERIKSSON a Thomas Fruegaard ASTRUP. Recycling of plastic waste: Presence of phthalates in plastics from households and industry. *Waste Management* [online]. 2016, **54**, 44–52. ISSN 18792456. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2016.05.014
- [28] EC. *REPORT FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS on the implementation of the Circular Economy Action Plan* [online]. 2019. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1551871195772&uri=CELEX:52019DC0190>
- [29] EUROPEAN COMMISSION. *Circular Economy* [online]. 2020. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/environment/circular-economy/>

- [30] FUENTES, Christian, Petronella ENARSSON a Love KRISTOFFERSSON. Unpacking package free shopping: Alternative retailing and the reinvention of the practice of shopping. *Journal of Retailing and Consumer Services* [online]. 2019, **50**(November 2018), 258–265. ISSN 09696989. Dostupné z: doi:10.1016/j.jretconser.2019.05.016
- [31] VERT, Michel, Yoshiharu DOI, Karl Heinz HELLWICH, Michael HESS, Philip HODGE, Przemyslaw KUBISA, Marguerite RINAUDO a François SCHUÉ. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2012, **84**(2), 377–410. ISSN 00334545. Dostupné z: doi:10.1351/pac-rec-10-12-04
- [32] NIAOUNAKIS, Michael. *Biopolymers: Applications and Trends*. 1st Editio. Amsterdam: Elsevier WA, 2015. ISBN 9780323353991.
- [33] *European bioplastics* [online]. [vid. 2019-11-29]. Dostupné z: <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/materials/>
- [34] LACKNER, Maximilian. *Bioplastics: Biobased Plastics As Renewable and / or Biodegradable Alternatives To* [online]. 2015. ISBN 0471238961. Dostupné z: doi:10.1002/0471238961.koe00006
- [35] EWA RUDNIK. *Compostable Polymer Materials* [online]. Amsterdam: Elsevier Ltd, 2008. ISBN 9788578110796. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- [36] ZEE, Maarten Van Der a Karin MOLENVELD. *The fate of (compostable) plastic products in a full scale industrial organic waste treatment facility*. 2020. ISBN 9789463953108.
- [37] MORGANTI, Pierfrancesco. *Bionanotechnology to Save the Environment* [online]. Basel: MDPI, 2019. ISBN 978-3-03842-693-6. Dostupné z: doi:10.3390/books978-3-03842-693-6
- [38] GREENE, Joseph. Biodegradation of compostable plastics in green yard-waste compost environment. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2007, **15**(4), 269–273. ISSN 15662543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-007-0068-1
- [39] IVANKOVIĆ, Anita, Karlo ZELJKO, Stanislava TALIC a Marija LASIĆ. Biodegradable Packaging in Food Industry. *Jornal of Food Safety and Food Quality* [online]. 2017, **68**(October), 23–52. Dostupné z: doi:10.2376/0003-925X-68-26
- [40] OJUMU, T. V., J. YU a B. O. SOLOMON. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2004, **3**(1), 18–24. ISSN 16845315. Dostupné z: doi:10.5897/AJB2004.000-2004
- [41] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M BANAT. Polyhydroxyalkanoates : Characteristics , production , recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, **126**(September 2017), 45–56. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001
- [42] REHM, Bernd H.A. *Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: A platform technology for the production of tailor-made bioparticles* [online]. 2007. ISSN 14673037. Dostupné z: doi:10.21775/cimb.009.041
- [43] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(May), 1–13. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep26612
- [44] KESSLER, Birgit a Bernard WITHOLT. Poly(3-Hydroxyalkanoates). In: *Encyclopedia of Bioprocess Technology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2002.

Dostupné z: doi:10.1002/0471250589.ebt168

- [45] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, Ota SAMEK a Ivana MAROVA. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, **100**(3), 1365–1376. ISSN 14320614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-7162-4
- [46] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian Jun LOH. *Polyhydroxyalkanoates: Opening doors for a sustainable future* [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 2016. ISSN 18844057. Dostupné z: doi:10.1038/am.2016.48
- [47] RYDZ, Joanna, Marta MUSIOŁ, Barbara ZAWIDLAK-W a Wanda SIKORSKA. *Polymers for Food Packaging Applications* [online]. 2018. ISBN 9780128114490. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811449-0/00014-1
- [48] TRIPATHI, Abhishek, S. K. SRIVASTAVA a Ajak YADAV. Biopolymers: Potential biodegradable packaging material for food industry. In: *Polymers for Packaging Applications*. Oakville: Apple Academic Press, 2015, s. 153–172. ISBN 9781926895772.
- [49] WEINMANN, Sandra a Christian BONTEN. Thermal and rheological properties of modified polyhydroxybutyrate (PHB). *Polymer Engineering and Science* [online]. 2019, **59**(5), 1057–1064. ISSN 15482634. Dostupné z: doi:10.1002/pen.25075
- [50] VOGEL, Christian, Shigeaki MORITA, Harumi SATO, Isao NODA, Yukihiro OZAKI a Heinz W. SIESLER. Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) in nitrogen and oxygen studied by thermogravimetric- fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy* [online]. 2007, **61**(7), 755–764. ISSN 00037028. Dostupné z: doi:10.1366/000370207781393370
- [51] ARIFFIN, Hidayah, Haruo NISHIDA, Yoshihito SHIRAI a Mohd Ali HASSAN. Determination of multiple thermal degradation mechanisms of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2008, **93**(8), 1433–1439. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2008.05.020
- [52] AOYAGI, Yoshihiro, Koichi YAMASHITA a Yoshiharu DOI. Thermal degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly[ε-caprolactone], and poly[(S)-lactide]. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2002, **76**(1), 53–59. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-3910(01)00265-8
- [53] PACHEKOSKI, Wagner Maurício, Carla DALMOLIN a José Augusto Marcondes AGNELLI. The influence of the industrial processing on the degradation of poly(hidroxybutyrate) - PHB. *Materials Research* [online]. 2013, **16**(2), 327–332. ISSN 15161439. Dostupné z: doi:10.1590/S1516-14392012005000180
- [54] BUGNICOURT, E., P. CINELLI, A. LAZZERI a V. ALVAREZ. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters* [online]. 2014, **8**(11), 791–808. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2014.82
- [55] DE KONING, G. J.M. a P. J. LEMSTRA. Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: 2. Embrittlement and rejuvenation. *Polymer* [online]. 1993, **34**(19), 4089–4094. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/0032-3861(93)90671-V



- [56] MENG, De Chuan, Zhen Yu SHI, Lin Ping WU, Qin ZHOU, Qiong WU, Jin Chun CHEN a Guo Qiang CHEN. Production and characterization of poly(3-hydroxypropionate-co-4-hydroxybutyrate) with fully controllable structures by recombinant *Escherichia coli* containing an engineered pathway. *Metabolic Engineering* [online]. 2012, **14**(4), 317–324. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2012.04.003
- [57] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **89**, 161–174. ISSN 18790003. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- [58] KOLLER, M. Poly(hydroxyalkanoates) for Food Packaging: Application and Attempts towards Implementation. *APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY*. 2014, **1**(1), 3–15.
- [59] SUDESH, K., H. ABE a Y. DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science (Oxford)* [online]. 2000, **25**(10), 1503–1555. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [60] ŠPITALSKÝ, Zdeno, Igor LACÍK, Elena LATHOVÁ, Ivica JANIGOVÁ a Ivan CHODÁK. Controlled degradation of polyhydroxybutyrate via alcoholysis with ethylene glycol or glycerol. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2006, **91**(4), 856–861. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2005.06.019
- [61] JANIGOVÁ, Ivica, Igor LACÍK a Ivan CHODÁK. Thermal degradation of plasticized poly(3-hydroxybutyrate) investigated by DSC. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2002, **77**(1), 35–41. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-3910(02)00077-0
- [62] WANG, Shichao, Wei CHEN, Hengxue XIANG, Junjie YANG, Zhe ZHOU a Meifang ZHU. Modification and potential application of short-chain-length polyhydroxyalkanoate (SCL-PHA). *Polymers* [online]. 2016, **8**(8). ISSN 20734360. Dostupné z: doi:10.3390/polym8080273
- [63] KOLLER, Martin, Anna SALERNO, Katharina STROHMEIER, Sigurd SCHOBBER, Martin MITTELBAACH, Vassilka ILLIEVA, Emo CHIELLINI a Gerhart BRAUNEGG. Novel precursors for production of 3-hydroxyvalerate-containing poly[(R)-hydroxyalkanoate]s. *Biocatalysis and Biotransformation* [online]. 2014, **32**(3), 161–167. ISSN 10292446. Dostupné z: doi:10.3109/10242422.2014.913580
- [64] CHEA, Vorleak, Hélène ANGELLIER-COUSSY, Stéphane PEYRON, Diana KEMMER a Nathalie GONTARD. Poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) films for food packaging: Physical-chemical and structural stability under food contact conditions. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2016, **133**(2). ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.41850
- [65] DI LORENZO, M. L., M. RAIMO, E. CASCONI a E. MARTUSCELLI. Poly(3-hydroxybutyrate)-based copolymers and blends: Influence of a second component on crystallization and thermal behavior. *Journal of Macromolecular Science - Physics* [online]. 2001, **40 B**(5), 639–667. ISSN 00222348. Dostupné z: doi:10.1081/MB-100107554
- [66] MARTÍNEZ-SANZ, Marta, Marianna VILLANO, Catarina OLIVEIRA, Maria G.E. ALBUQUERQUE, Mauro MAJONE, Maria REIS, Amparo LOPEZ-RUBIO a Jose M. LAGARON. Characterization of polyhydroxyalkanoates synthesized from microbial

- mixed cultures and of their nanobiocomposites with bacterial cellulose nanowhiskers. *New Biotechnology* [online]. 2014, **31**(4), 364–376. ISSN 18764347. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2013.06.003
- [67] YU, Yang, Lin SANG, Zhiyong WEI, Xuefei LENG a Yang LI. Unique isodimorphism and isomorphism behaviors of even-odd poly(hexamethylene dicarboxylate) aliphatic copolyesters. *Polymer* [online]. 2017, **115**, 106–117. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2017.03.034
- [68] JAVADI, Alireza, Srikanth PILLA, Shaoqin GONG a Lih-Sheng TURNG. Biobased and Biodegradable PHBV-Based Polymer Blends and Biocomposites: Properties and Applications. In: *Handbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011, s. 372–396. Dostupné z: doi:10.1002/9781118203699.ch14
- [69] DOI, Yoshiharu, Shiro KITAMURA a Hideki ABE. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* [online]. 1995, **28**(14), 4822–4828. ISSN 15205835. Dostupné z: doi:10.1021/ma00118a007
- [70] KUNIOKA, Masao, Akira TAMAKI a Yoshiharu DOI. Crystalline and Thermal Properties of Bacterial Copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* [online]. 1989, **22**(2), 694–697. ISSN 15205835. Dostupné z: doi:10.1021/ma00192a031
- [71] LI, Lingling, Linxuan YANG, Jingjing TANG, Jinjun YANG, Wei LI, Shanshan ZHOU, Huimin MA, Haibo ZHU a Zhen ZHU. Modulated crystallization behavior of bacterial copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate): Effect of a linear multiple amides derivative as a nucleator. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* [online]. 2020, **0**(0), 1–12. ISSN 15205738. Dostupné z: doi:10.1080/10601325.2019.1710534
- [72] BHATIA, Shashi Kant, Ranjit GURAV, Tae Rim CHOI, Hye Rim JUNG, Soo Yeon YANG, Hun Suk SONG, Jong Min JEON, Jae Seok KIM, Yoo Kyung LEE a Yung Hun YANG. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) production from engineered *Ralstonia eutropha* using synthetic and anaerobically digested food waste derived volatile fatty acids. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **133**, 1–10. ISSN 18790003. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.04.083
- [73] SHANGGUAN, Ying Ying, Ya Wu WANG, Qiong WU a Guo Qiang CHEN. The mechanical properties and in vitro biodegradation and biocompatibility of UV-treated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Biomaterials* [online]. 2006, **27**(11), 2349–2357. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.11.024
- [74] VIGNESWARI, S., J. M. CHAI, K. SHANTINI, K. BHUBALAN a A. A. AMIRUL. Designing novel interfaces via surface functionalization of short-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Advances in Polymer Technology* [online]. 2019, **2019**. ISSN 10982329. Dostupné z: doi:10.1155/2019/3831251
- [75] VIGNESWARI, S., S. VIJAYA, M. I.A. MAJID, K. SUDESH, C. S. SIPAUT, M. N.M. AZIZAN a A. A. AMIRUL. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer with manipulated variables and its properties. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, **36**(4), 547–556. ISSN 13675435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-009-0525-z
- [76] LAYCOCK, Bronwyn, Peter HALLEY, Steven PRATT, Alan WERKER a Paul LANT. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in*

- Polymer Science* [online]. 2014, **39**(2), 397–442. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.06.008
- [77] SAITO, Yuji a Yoshiharu DOI. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1994, **16**(2), 99–104. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/0141-8130(94)90022-1
- [78] CHEE, Jee Wei, A. A. AMIRUL, T. S. TENGKU MUHAMMAD, M. I.A. MAJID a S. M. MANSOR. The influence of copolymer ratio and drug loading level on the biocompatibility of P(3HB-co-4HB) synthesized by *Cupriavidus* sp. (USMAA2-4). *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2008, **38**(3), 314–318. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2007.07.018
- [79] HONG, Shinn Gwo, Heng Wei HSU a Min Tzung YE. Thermal properties and applications of low molecular weight polyhydroxybutyrate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [online]. 2013, **111**(2), 1243–1250. ISSN 13886150. Dostupné z: doi:10.1007/s10973-012-2503-3
- [80] SEOANE, Irene Teresita, Liliana Beatriz MANFREDI a Viviana Paola CYRAS. Effect of two different plasticizers on the properties of poly(3-hydroxybutyrate) binary and ternary blends. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2018, **135**(12), 1–12. ISSN 10974628. Dostupné z: doi:10.1002/app.46016
- [81] JOST, Verena a Horst Christian LANGOWSKI. Effect of different plasticisers on the mechanical and barrier properties of extruded cast PHBV films. *European Polymer Journal* [online]. 2015, **68**, 302–312. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.04.012
- [82] VAŠKOVÁ, Ida, Pavol ALEXY, Peter BUGAJ, Anna NAHÁLKOVÁ, Jozef FERANC a Tomáš MLYNSKÝ. Biodegradable polymer packaging materials based on polycaprolactone, starch and polyhydroxybutyrate. *Acta Chimica Slovaca* [online]. 2008, **1**(1), 301–308. Dostupné z: www.acs.chtf.stuba.sk/papers/acs\_0026.pdf
- [83] SAVENKOVA, L., Z. GERBERGA, V. NIKOLAEVA, A. DZENE, I. BIBERS a M. KALNIN. Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films. *Process Biochemistry* [online]. 2000, **35**(6), 573–579. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-9592(99)00107-7
- [84] ERCEG, Matko, Tonka KOVAČIĆ a Ivka KLARIĆ. Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) plasticized with acetyl tributyl citrate. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2005, **90**(2 SPEC. ISS.), 313–318. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2005.04.048
- [85] KUNZE, Carmen, Thomas FREIER, Sven KRAMER a Klaus Peter SCHMITZ. Anti-inflammatory prodrugs as plasticizers for biodegradable implant materials based on poly(3-hydroxybutyrate). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2002, **13**(11), 1051–1055. ISSN 09574530. Dostupné z: doi:10.1023/A:1020392606225
- [86] CHOI, Byoung Koo. Ionic conductivity change depending on thermal history in PEO-LiClO<sub>4</sub> polymer electrolytes. *Polymer (Korea)* [online]. 2004, **28**(6), 455–459. ISSN 0379153X. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymertesting.2003.09.005
- [87] BIBERS, Ivars, Velta TUPUREINA, Anda DZENE, Ludmila SAVENKOVA a Martins KALNINS. Biodegradable materials from plasticized PHB biomass. *Macromolecular Symposia* [online]. 2001, **170**, 61–72. ISSN 10221360. Dostupné z: doi:10.1002/1521-3900(200106)170:1<61::AID-MASY61>3.0.CO;2-7

- [88] NAFFAKH, Mohammed, Carlos MARCO a Gary ELLIS. Inorganic WS2 nanotubes that improve the crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyrate). *CrystEngComm* [online]. 2014, **16**(6), 1126–1135. ISSN 14668033. Dostupné z: doi:10.1039/c3ce41987h
- [89] WANG, Liang, Xiaojuan WANG, Wenfu ZHU, Zhifei CHEN, Jueyu PAN a Kaitian XU. Effect of nucleation agents on the crystallization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (P3/4HB). *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2009, **116**(5), n/a-n/a. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.31588
- [90] SHAN, Gui Fang, Xue GONG, Wen Ping CHEN, Long CHEN a Mei Fang ZHU. Effect of multi-walled carbon nanotubes on crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Colloid and Polymer Science* [online]. 2011, **289**(9), 1005–1014. ISSN 0303402X. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-011-2412-1
- [91] BUZAROVSKA, Aleksandra, Anita GROZDANOV, M. AVELLA, G. GENTILE a M. ERRICO. Poly(hydroxybutyrate-co -hydroxyvalerate)/titanium dioxide nanocomposites: A degradation study. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2009, **114**(5), 3118–3124. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.30867
- [92] SRIDHAR, V., I. LEE, H. H. CHUN a H. PARK. Graphene reinforced biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) nano-composites. *Express Polymer Letters* [online]. 2013, **7**(4), 320–328. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2013.29
- [93] ÖNER, Mualla a Berna ILHAN. Fabrication of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biocomposites with reinforcement by hydroxyapatite using extrusion processing. *Materials Science and Engineering C* [online]. 2016, **65**, 19–26. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2016.04.024
- [94] YU, Hou Yong, Zong Yi QIN, Yan Nan LIU, Long CHEN, Na LIU a Zhe ZHOU. Simultaneous improvement of mechanical properties and thermal stability of bacterial polyester by cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, **89**(3), 971–978. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2012.04.053
- [95] THARANATHAN, Rudrapatnam N. a Farooqahmed S. KITTUR. Chitin - The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2003, **43**(1), 61–87. ISSN 10408398. Dostupné z: doi:10.1080/10408690390826455
- [96] WANG, Bingjie, Jun LI, Jianqiang ZHANG, Huyan LI, Peng CHEN, Qun GU a Zongbao WANG. Thermo-mechanical properties of the composite made of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and acetylated chitin nanocrystals. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, **95**(1), 100–106. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.055
- [97] KUN, Dávid a Béla PUKÁNSZKY. Polymer/lignin blends: Interactions, properties, applications. *European Polymer Journal* [online]. 2017, **93**(December 2016), 618–641. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.04.035
- [98] YANG, Jianlei, Yern Chee CHING a Cheng Hock CHUAH. Applications of lignocellulosic fibers and lignin in bioplastics: A review. *Polymers* [online]. 2019, **11**(5), 1–26. ISSN 20734360. Dostupné z: doi:10.3390/polym11050751
- [99] LUO, Shupin, Jinzhen CAO a Armando G. MCDONALD. Interfacial Improvements in a Green Biopolymer Alloy of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Lignin via in Situ Reactive Extrusion. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* [online]. 2016, **4**(6), 3465–3476. ISSN 21680485. Dostupné

z: doi:10.1021/acssuschemeng.6b00495

- [100] KAI, Dan, Kangyi ZHANG, Sing Shy LIOW a Xian Jun LOH. New Dual Functional PHB-Grafted Lignin Copolymer: Synthesis, Mechanical Properties, and Biocompatibility Studies. *ACS Applied Bio Materials* [online]. 2019, **2**(1), 127–134. ISSN 25766422. Dostupné z: doi:10.1021/acsabm.8b00445
- [101] LUO, Shupin, Jinzhen CAO a Armando G. MCDONALD. Esterification of industrial lignin and its effect on the resulting poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) or polypropylene blends. *Industrial Crops and Products* [online]. 2017, **97**, 281–291. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2016.12.024
- [102] CAMARGO, Francisco A., Lucia H. INNOCENTINI-MEI, Ana Paula LEMES, Sandra G. MORAES a Nelson DURÁN. Processing and characterization of composites of poly(3-hydroxybutyrate-co- hydroxyvalerate) and lignin from sugar cane bagasse. *Journal of Composite Materials* [online]. 2012, **46**(4), 417–425. ISSN 00219983. Dostupné z: doi:10.1177/0021998311418389
- [103] ANGELINI, Stefania, Pierfrancesco CERRUTI, Barbara IMMIRZI, Gennaro SCARINZI a Mario MALINCONICO. Acid-insoluble lignin and holocellulose from a lignocellulosic biowaste: Bio-fillers in poly(3-hydroxybutyrate). *European Polymer Journal* [online]. 2016, **76**, 63–76. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2016.01.024
- [104] MOUSAVIOUN, Payam, William O.S. DOHERTY a Graeme GEORGE. Thermal stability and miscibility of poly(hydroxybutyrate) and soda lignin blends. *Industrial Crops and Products* [online]. 2010, **32**(3), 656–661. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2010.08.001
- [105] SHICHAO, Wang, Xiang HENGXUE, Wang RENLIN, Zhou ZHE a Zhu MEIFANG. Influence of amorphous alkaline lignin on the crystallization behavior and thermal properties of bacterial polyester. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2015, **132**(4), 1–9. ISSN 10974628. Dostupné z: doi:10.1002/app.41325
- [106] VAIDYA, Alankar A., Christophe COLLET, Marc GAUGLER a Gareth LLOYD-JONES. Integrating softwood biorefinery lignin into polyhydroxybutyrate composites and application in 3D printing. *Materials Today Communications* [online]. 2019, **19**(February), 286–296. ISSN 23524928. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtcomm.2019.02.008
- [107] WELLEN, Renate Maria Ramos, Eduardo Luís CANEDO, Camila Augusta Ventura LIMA, Inaldo Cesar Araújo JÚNIOR, Yêda Medeiros Bastos DE ALMEIDA a Marcelo Silveira RABELLO. The effect of polystyrene on the crystallization of poly(3-hydroxybutyrate). *Materials Research* [online]. 2015, **18**(2), 235–239. ISSN 15161439. Dostupné z: doi:10.1590/1516-1439.242213
- [108] WANG, Shichao, Hengxue XIANG, Renlin WANG, Cheng PENG, Zhe ZHOU a Meifang ZHU. Morphology and properties of renewable poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) blends with thermoplastic polyurethane. *Polymer Engineering & Science* [online]. 2014, **54**(5), 1113–1119. ISSN 00323888. Dostupné z: doi:10.1002/pen.23655
- [109] CECCORULLI, Giuseppina, Mariastella SCANDOLA a Grazyna ADAMUS. Compatibilizing effect of a graft copolymer on bacterial poly(3-hydroxybutyrate)/poly(methyl methacrylate) blends. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* [online]. 2002, **40**(13), 1390–1399. ISSN 08876266. Dostupné z: doi:10.1002/polb.10202

- [110] MADBOULY, Samy A., Ashraf A. MANSOUR a Nahed Y. ABDOL. Crystallization kinetics of PHB/PVAc blends using time resolved dielectric spectroscopy. *European Polymer Journal* [online]. 2007, **43**(9), 3933–3942. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2007.06.020
- [111] BROŽEK, Jiří, Václava BENEŠOVÁ, Lenka MALINOVÁ, Radka KALOUSKOVÁ, Karel ŠANDA a Zdeňka LEDROVÁ. KYSELINA POLYMLÉČNÁ – MATERIÁL PRO BIODEGRADOVATELNÉ ODĚVNÍ A TECHNICKÉ TEXTILIE. *Chemické listy*. 2015, **109**(4), 291–297.
- [112] ABDELWAHAB, Mohamed A., Allison FLYNN, Bor Sen CHIOU, Syed IMAM, William ORTS a Emo CHIELLINI. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA-PHB blends. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2012, **97**(9), 1822–1828. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.036
- [113] ZHANG, Lianlai, Chengdong XIONG a Xianmo DENG. Miscibility, crystallization and morphology of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)/poly(d,l-lactide) blends. *Polymer* [online]. 1996, **37**(2), 235–241. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/0032-3861(96)81093-7
- [114] ZEMBOUAI, Idris, Stéphane BRUZAUD, Mustapha KACI, Aida BENHAMIDA, Yves Marie CORRE, Yves GROHENS, Aurélie TAGUET a José Marie LOPEZ-CUESTA. Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate)/Polylactide Blends: Thermal Stability, Flammability and Thermo-Mechanical Behavior. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2014, **22**(1), 131–139. ISSN 15662543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-013-0626-7
- [115] FURUKAWA, Tsuyoshi, Harumi SATO, Rumi MURAKAMI, Jianming ZHANG, Isao NODA, Shukichi OCHIAI a Yukihiro OZAKI. Comparison of miscibility and structure of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)/poly(l-lactic acid) blends with those of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(l-lactic acid) blends studied by wide angle X-ray diffraction, differential scanning calorimetry. *Polymer* [online]. 2007, **48**(6), 1749–1755. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2007.01.020
- [116] ZHAO, Hongwei, Yijie BIAN, Yi LI, Qinglin DONG, Changyu HAN a Lisong DONG. Bioresource-based blends of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and stereocomplex polylactide with improved rheological and mechanical properties and enzymatic hydrolysis. *Journal of Materials Chemistry A* [online]. 2014, **2**(23), 8881–8892. ISSN 20507496. Dostupné z: doi:10.1039/c4ta01194e
- [117] WOODRUFF, Maria Ann a Dietmar Werner HUTMACHER. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)* [online]. 2010, **35**(10), 1217–1256. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002
- [118] DEL GAUDIO, Costantino, Lara FIORAVANZO, Marcella FOLIN, Fabiana MARCHI, Enrico ERCOLANI a Alessandra BIANCO. Electrospun tubular scaffolds: On the effectiveness of blending poly( $\epsilon$ -caprolactone) with poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* [online]. 2012, **100** B(7), 1883–1898. ISSN 15524973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.32756
- [119] LIM, Jing, Mark Seow Khoon CHONG, Erin Yiling TEO, Guo Qiang CHEN, Jerry K.Y. CHAN a Swee Hin TEOH. Biocompatibility studies and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyhexanoate)/polycaprolactone blends. *Journal of*

- Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* [online]. 2013, **101 B**(5), 752–761. ISSN 15524973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.32878
- [120] ROY, Debashish, Mona SEMSARILAR, James T. GUTHRIE a Sébastien PERRIER. Cellulose modification by polymer grafting: A review. *Chemical Society Reviews* [online]. 2009, **38**(7), 2046–2064. ISSN 03060012. Dostupné z: doi:10.1039/b808639g
- [121] WEI, Liqing, Nicole M. STARK a Armando G. MCDONALD. Interfacial improvements in biocomposites based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) bioplastics reinforced and grafted with  $\alpha$ -cellulose fibers. *Green Chemistry* [online]. 2015, **17**(10), 4800–4814. ISSN 14639270. Dostupné z: doi:10.1039/c5gc01568e
- [122] WEI, Liqing, Armando G. MCDONALD a Nicole M. STARK. Grafting of Bacterial Polyhydroxybutyrate (PHB) onto Cellulose via In Situ Reactive Extrusion with Dicumyl Peroxide. *Biomacromolecules* [online]. 2015, **16**(3), 1040–1049. ISSN 15264602. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.5b00049
- [123] WANG, Jing, Zongbao WANG, Jun LI, Bingjie WANG, Ji LIU, Peng CHEN, Menghe MIAO a Qun GU. Chitin nanocrystals grafted with poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their effects on thermal behavior of PHBV. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, **87**(1), 784–789. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2011.08.066
- [124] TORRES, Maykel González, Susana Vargas MUÑOZ, Silvia G.Solís ROSALES, Ma Del Pilar CARREÓN-CASTRO, Rodrigo Alonso Esparza MUÑOZ, Olayo O. ROBERTO, Miriam Rocío Estévez GONZÁLEZ a Rogelio Rodríguez TALAVERA. Radiation-induced graft polymerization of chitosan onto poly(3-hydroxybutyrate). *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, **133**, 482–492. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2015.07.032
- [125] HAZER, Baki a Alexander STEINBÜCHEL. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007, **74**(1), 1–12. ISSN 01757598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-006-0732-8
- [126] BHATTACHARYA, Amit, James W. RAWLINS a Paramita RAY. *Polymer grafting and crosslinking*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009. ISBN 978-0-470-40465-2.
- [127] FEI, Bin, Cheng CHEN, Shan CHEN, Shuwen PENG, Yugang ZHUANG, Yuxian AN a Lisong DONG. Crosslinking of poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)] using dicumyl peroxide as initiator. *Polymer International* [online]. 2004, **53**(7), 937–943. ISSN 09598103. Dostupné z: doi:10.1002/pi.1477
- [128] KOLAHCHI, Ahmad Rezaei a Marianna KONTOPOULOU. Chain extended poly(3-hydroxybutyrate) with improved rheological properties and thermal stability, through reactive modification in the melt state. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2015, **121**, 222–229. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2015.09.008
- [129] IOV. *2019 Statistical Report on World Vitiviniculture* [online]. 2019. Dostupné z: doi:64/19/6835 [pii]n10.1158/0008-5472.CAN-04-1678
- [130] BUBLÍKOVÁ, Lenka. *Réva vinná a víno Situační a výhledová zpráva* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2019. ISBN 978-80-7434-531-9. Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/644471/SVZ\\_\\_\\_Vino\\_2019.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/644471/SVZ___Vino_2019.pdf)

- [131] BUSTAMANTE, M. A., R. MORAL, C. PAREDES, A. PÉREZ-ESPINOSA, J. MORENO-CASELLES a M. D. PÉREZ-MURCIA. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management* [online]. 2008, **28**(2), 372–380. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2007.01.013
- [132] DEVESA-REY, R., X. VECINO, J. L. VARELA-ALENDE, M. T. BARRAL, J. M. CRUZ a A. B. MOLDES. Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management* [online]. 2011, **31**(11), 2327–2335. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2011.06.001
- [133] MUHLACK, Richard A., Ravichandra POTUMARTHI a David W. JEFFERY. Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. *Waste Management* [online]. 2018, **72**, 99–118. ISSN 18792456. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2017.11.011
- [134] CVINER, Petr, Karolína PÁDROVÁ a Irena KOLOUCHOVÁ. Moderní možnosti využití odpadních surovin ze zpracování vinných hroznů. *Chemické listy* [online]. 2017, **111**(2), 103–108. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2017\\_02\\_103-108.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2017_02_103-108.pdf)
- [135] DÁVILA, Izaskun, Eduardo ROBLES, Itziar EGÜÉS, Jalel LABIDI a Patricia GULLÓN. *The Biorefinery Concept for the Industrial Valorization of Grape Processing By-Products* [online]. B.m.: Elsevier Inc., 2017. ISBN 9780128098714. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809870-7.00002-8
- [136] GÓMEZ-BRANDÓN, María, Marta LORES, Heribert INSAM a Jorge DOMÍNGUEZ. Strategies for recycling and valorization of grape marc. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2019, **39**(4), 437–450. ISSN 15497801. Dostupné z: doi:10.1080/07388551.2018.1555514
- [137] MAROUN, Richard G., Hiba N. RAJHA, Eugene VOROBIEV a Nicolas LOUKA. Emerging Technologies for the Recovery of Valuable Compounds From Grape Processing By-Products. In: *Handbook of Grape Processing By-Products* [online]. B.m.: Elsevier, 2017, s. 155–181. ISBN 9780128112915. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809870-7.00007-7
- [138] FONTANA, Ariel R., Andrea ANTONIOLLI a Rubén BOTTINI. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, **61**(38), 8987–9003. ISSN 00218561. Dostupné z: doi:10.1021/jf402586f
- [139] KY, Isabelle, Bénédicte LORRAIN, Natallia KOLBAS, Alan CROZIER a Pierre Louis TEISSEDRE. Wine by-Products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules* [online]. 2014, **19**(1), 482–506. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules19010482
- [140] YU, Jianmei a Mohamed AHMEDNA. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology* [online]. 2013, **48**(2), 221–237. ISSN 09505423. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x
- [141] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin 2*. Havlíčkův Brod: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [142] KRUGER, Maria J., Neil DAVIES, Kathryn H. MYBURGH a Sandrine LECOUR. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Research*



- International* [online]. 2014, **59**, 41–52. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2014.01.046
- [143] HE, Jian a M. Monica GIUSTI. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology* [online]. 2010, **1**(1), 163–187. ISSN 1941-1413. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.food.080708.100754
- [144] SCHLICH, M., F. LAI, R. PIREDDU, E. PINI, Giorgia AILUNO, A.M. FADDA, D. VALENTI a C. SINICO. Resveratrol proniosomes as a convenient nanoingredient for functional food. *Food Chemistry* [online]. 2020, **310**(July 2019), 10. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2019.125950
- [145] AKINWUMI, Bolanle C., Kimberly Ann M. BORDUN a Hope D. ANDERSON. Biological activities of stilbenoids. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(3), 1–25. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19030792
- [146] TOURNOUR, Hernán H., Marcela A. SEGUNDO, Luís M. MAGALHÃES, Luísa BARREIROS, Jorge QUEIROZ a Luís M. CUNHA. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, **74**, 397–406. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2015.05.055
- [147] PENG, Xiaofang, Jinyu MA, Ka-Wing CHENG, Yue JIANG, Feng CHEN a Mingfu WANG. The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. *Food Chemistry* [online]. 2010, **119**(1), 49–53 [vid. 2020-03-15]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/J.FOODCHEM.2009.05.083
- [148] SÁYAGO-AYERDI, S.G., A. BRENES, A. VIVEROS a I. GOÑI. Antioxidative effect of dietary grape pomace concentrate on lipid oxidation of chilled and long-term frozen stored chicken patties. *Meat Science* [online]. 2009, **83**(3), 528–533 [vid. 2020-03-15]. ISSN 0309-1740. Dostupné z: doi:10.1016/J.MEATSCI.2009.06.038
- [149] BRENES, Agustín, Agustín VIVEROS, Susana CHAMORRO a Ignacio ARIJA. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology* [online]. 2016, **211**, 1–17. ISSN 03778401. Dostupné z: doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016
- [150] JONGBERG, Sisse, Sabina H. SKOV, Mari Ann TØRNGREN, Leif H. SKIBSTED a Marianne N. LUND. Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. *Food Chemistry* [online]. 2011, **128**(2), 276–283 [vid. 2020-03-15]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/J.FOODCHEM.2011.03.015
- [151] GARRIDO, María Dolores, Mariella AUQUI, Nuría MARTÍ a María Belén LINARES. Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction systems on meat quality of pork burgers. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2011, **44**(10), 2238–2243 [vid. 2020-03-15]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: doi:10.1016/J.LWT.2011.07.003
- [152] PAZOS, Manuel, José Manuel GALLARDO, Josep Lluís TORRES a Isabel MEDINA. Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry* [online]. 2005, **92**(3), 547–557. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2004.07.036
- [153] HAN, Jaejoon, Michel BRITTEN, Daniel ST-GELAIS, Claude P. CHAMPAGNE, Patrick FUSTIER, Stéphane SALMIERI a Monique LACROIX. Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. *Food Chemistry* [online]. 2011, **124**(4), 1589–1594. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.021

- [154] TSENG, Angela a Yanyun ZHAO. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry* [online]. 2013, **138**(1), 356–365. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.148
- [155] XU, Changmou, Yavuz YAGIZ, Sara MARSHALL, Zheng LI, Amarat SIMONNE, Jiang LU a Maurice R. MARSHALL. Application of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace extract to reduce carcinogenic acrylamide. *Food Chemistry* [online]. 2015, **182**, 200–208. ISSN 18737072. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.133
- [156] TSALI, Alexandra a Athanasia M. GOULA. Valorization of grape pomace: Encapsulation and storage stability of its phenolic extract. *Powder Technology* [online]. 2018, **340**, 194–207. ISSN 1873328X. Dostupné z: doi:10.1016/j.powtec.2018.09.011
- [157] RIVERA, Oscar Manuel Portilla, Ana Belén MOLDES, Ana María TORRADO a José Manuel DOMÍNGUEZ. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. *Process Biochemistry* [online]. 2007, **42**(6), 1010–1020. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2007.03.011
- [158] RODRÍGUEZ, L. A., M. E. TORO, F. VAZQUEZ, M. L. CORREA-DANERI, S. C. GOURIC a M. D. VALLEJO. Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* [online]. 2010, **35**(11), 5914–5917. ISSN 03603199. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijhydene.2009.12.112
- [159] FIORI, Luca. Supercritical extraction of grape seed oil at industrial-scale: Plant and process design, modeling, economic feasibility. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* [online]. 2010, **49**(8), 866–872. ISSN 02552701. Dostupné z: doi:10.1016/j.cep.2010.06.001
- [160] YANG, Shang Tian. Bioprocessing-from Biotechnology to Biorefinery. In: *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* [online]. B.m.: Elsevier, 2007, s. 1–24. ISBN 9780444521149. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044452114-9/50002-5
- [161] MUDGIL, Deepak a Sheweta BARAK. *Classification, Technological Properties, and Sustainable Sources* [online]. B.m.: Elsevier Inc., 2019. ISBN 9780128164952. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-816495-2.00002-2
- [162] BROWN, Margaret E. a Michelle C.Y. CHANG. Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2014, **19**(1), 1–7. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2013.11.015
- [163] KAI, Dan, Mein Jin TAN, Pei Lin CHEE, Yun Khim CHUA, Yong Liang YAP a Xian Jun LOH. Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. *Green Chemistry* [online]. 2016, **18**(5), 1175–1200. ISSN 14639270. Dostupné z: doi:10.1039/c5gc02616d
- [164] UPTON, Brianna M. a Andrea M. KASKO. Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric materials: Review and perspective. *Chemical Reviews* [online]. 2016, **116**(4), 2275–2306. ISSN 15206890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00345
- [165] ALZAGAMEEM, Abba, Basma El KHALDI-HANSEN, Dominik BÜCHNER, Michael LARKINS, Birgit KAMM, Steffen WITZLEBEN a Margit SCHULZE. Lignocellulosic biomass as source for lignin-based environmentally benign antioxidants. *Molecules* [online]. 2018, **23**(10). ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23102664

- [166] TRIBOT, Amélie, Ghenima AMER, Maarouf ABDOL ALIO, Hélène DE BAYNAST, Cédric DELATTRE, Agnès PONS, Jean Denis MATHIAS, Jean Marc CALLOIS, Christophe VIAL, Philippe MICHAUD a Claude Gilles DUSSAP. Wood-lignin: Supply, extraction processes and use as bio-based material. *European Polymer Journal* [online]. 2019, **112**(October 2018), 228–240. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.01.007
- [167] AYYACHAMY, Manimaran, Finola E. CLIFFE, Jessica M. COYNE, John COLLIER a Maria G. TUOHY. Lignin: Untapped biopolymers in biomass conversion technologies. *Biomass Conversion and Biorefinery* [online]. 2013, **3**(3), 255–269. ISSN 21906823. Dostupné z: doi:10.1007/s13399-013-0084-4
- [168] COLLINS, Maurice N., Mărioara NECHIFOR, Fulga TANASĂ, Mădălina ZĂNOAGĂ, Anne MCLOUGHLIN, Michał A. STRÓŻYK, Mario CULEBRAS a Carmen Alice TEACĂ. Valorization of lignin in polymer and composite systems for advanced engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **131**, 828–849. ISSN 18790003. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.069
- [169] SCHUTYSER, W., T. RENDERS, S. VAN DEN BOSCH, S. F. KOELEWIJN, G. T. BECKHAM a B. F. SELS. Chemicals from lignin: An interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chemical Society Reviews* [online]. 2018, **47**(3), 852–908. ISSN 14604744. Dostupné z: doi:10.1039/c7cs00566k
- [170] RINALDI, Roberto, Robin JASTRZEBSKI, Matthew T. CLOUGH, John RALPH, Marco KENNEMA, Pieter C.A. BRUIJNINCX a Bert M. WECKHUYSEN. Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis. *Angewandte Chemie - International Edition* [online]. 2016, **55**(29), 8164–8215. ISSN 15213773. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201510351
- [171] CHEN, Hongzhang. *Lignocellulose biorefinery feedstock engineering* [online]. 2015. ISBN 9780081001356. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-08-100135-6.00003-x
- [172] ROBERTS, J. C. *The chemistry of paper*. 1st Editio. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1996. ISBN 0-85404-518-X.
- [173] BAJPAI, Pratima. Pulp Bleaching. *Biermann's Handbook of Pulp and Paper* [online]. 2018, 465–491. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-814240-0.00019-7
- [174] TOLBERT, Allison, Hannah AKINOSHO, Ratayakorn KHUNSUPAT, Amit K. NASKAR a Arthur J. RAGAUSKAS. Characterization and analysis of the molecular weight of lignin for biorefining studies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* [online]. 2014, **8**(6), 836–856. ISSN 1932104X. Dostupné z: doi:10.1002/bbb.1500
- [175] DOMENEK, Sandra, Abderrahim LOUAIFI, Alain GUINAULT a Stéphanie BAUMBERGER. Potential of Lignins as Antioxidant Additive in Active Biodegradable Packaging Materials. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2013, **21**(3), 692–701. ISSN 15662543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-013-0570-6
- [176] PAN, Xuejun, John F. KADLA, Katsunobu EHARA, Neil GILKES a Jack N. SADDLER. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: Relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, **54**(16), 5806–5813. ISSN 00218561. Dostupné z: doi:10.1021/jf0605392
- [177] SADEGHIFAR, Hasan a Dimitris S. ARGYROPOULOS. Correlations of the antioxidant properties of softwood kraft lignin fractions with the thermal stability of its blends with polyethylene. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* [online]. 2015, **3**(2), 349–356. ISSN 21680485. Dostupné z: doi:10.1021/sc500756n

- [178] GREGOROVÁ, A., Z. CIBULKOVÁ, B. KOŠÍKOVÁ a P. ŠIMON. Stabilization effect of lignin in polypropylene and recycled polypropylene. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2005, **89**(3), 553–558. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2005.02.007
- [179] POUTEAU, C., P. DOLE, B. CATHALA, L. AVEROUS a N. BOQUILLON. Antioxidant properties of lignin in polypropylene. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2003, **81**(1), 9–18. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-3910(03)00057-0
- [180] ARSHANITSA, Alexander, Jevgenija PONOMARENKO, Tatiana DIZHBITE, Anna ANDERSONE, Richard J.A. GOSSELINK, Jacinta VAN DER PUTTEN, Maris LAUBERTS a Galina TELYSHEVA. Fractionation of technical lignins as a tool for improvement of their antioxidant properties. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* [online]. 2013, **103**, 78–85. ISSN 01652370. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaap.2012.12.023
- [181] YANG, W., J. S. OWCZAREK, E. FORTUNATI, M. KOZANECKI, A. MAZZAGLIA, G. M. BALESTRA, J. M. KENNY, L. TORRE a D. PUGLIA. Antioxidant and antibacterial lignin nanoparticles in polyvinyl alcohol/chitosan films for active packaging. *Industrial Crops and Products* [online]. 2016, **94**, 800–811. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2016.09.061
- [182] VINARDELL, Maria Pilar a Montserrat MITJANS. Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(6). ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18061219
- [183] OBRUCA, Stanislav, Ivana MAROVA, Ondrej SNAJDAR, Ludmila MRAVCOVA a Zdenek SVOBODA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters* [online]. 2010, **32**(12), 1925–1932. ISSN 01415492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-010-0376-8
- [184] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Sinisa PETRIK, Jana OBORNA, Radek PRIKRYL a Ivana MAROVA. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry* [online]. 2014, **49**(9), 1409–1414. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2014.05.013
- [185] RIEDEL, Sebastian L., Stefan JAHNS, Steven KOENIG, Martina C.E. BOCK, Christopher J. BRIGHAM, Johannes BADER a Ulf STAHL. Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats. *Journal of Biotechnology* [online]. 2015, **214**, 119–127. ISSN 18734863. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2015.09.002
- [186] SVÄRD, Antonia, Rosana MORIANA, Elisabet BRÄNNVALL a Ulrica EDLUND. Rapeseed Straw Biorefinery Process. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* [online]. 2019, **7**(1), 790–801. ISSN 21680485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.8b04420
- [187] EKSPERIANDOVA, L. P., O. I. FEDOROV a N. A. STEPANENKO. Estimation of metrological characteristics of the element analyzer EuroVector EA-3000 and its potential in the single-reactor CHNS mode. *Microchemical Journal* [online]. 2011, **99**(2), 235–238. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2011.05.005
- [188] OLEJAR, Kenneth J., Sudip RAY, Arianna RICCI a Paul A. KILMARTIN. Superior antioxidant polymer films created through the incorporation of grape tannins in ethyl cellulose. *Cellulose* [online]. 2014, **21**(6), 4545–4556. ISSN 09690239. Dostupné

z: doi:10.1007/s10570-014-0447-4

- [189] ROSSBERG, Christine, Martina BREMER, Susanne MACHILL, Svetlana KOENIG, Gerhard KERNS, Carmen BOERIU, Elisabeth WINDEISEN a Steffen FISCHER. Separation and characterisation of sulphur-free lignin from different agricultural residues. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, **73**(2015), 81–89. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2015.04.001
- [190] GONG, Weihua, Zhuoya XIANG, Fayin YE a Guohua ZHAO. Composition and structure of an antioxidant acetic acid lignin isolated from shoot shell of bamboo (*Dendrocalamus Latiforus*). *Industrial Crops and Products* [online]. 2016, **91**, 340–349. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2016.07.023
- [191] MANARA, P., A. ZABANIOTOU, C. VANDERGHEM a A. RICHEL. Lignin extraction from Mediterranean agro-wastes: Impact of pretreatment conditions on lignin chemical structure and thermal degradation behavior. *Catalysis Today* [online]. 2014, **223**, 25–34. ISSN 09205861. Dostupné z: doi:10.1016/j.cattod.2013.10.065
- [192] SAHOO, S., M. Ö SEYDIBEYOĞLU, A. K. MOHANTY a M. MISRA. Characterization of industrial lignins for their utilization in future value added applications. *Biomass and Bioenergy* [online]. 2011, **35**(10), 4230–4237. ISSN 09619534. Dostupné z: doi:10.1016/j.biombioe.2011.07.009
- [193] WAISSER, Karel a Milan POUR. *Fyzikální metody organické chemie*. Praha: Karolinum, 2017. ISBN 978-80-246-3189-9.
- [194] SHI, Zhengjun, Gaofeng XU, Jia DENG, Mengyao DONG, Vignesh MURUGADOSS, Chuntai LIU, Qian SHAO, Shide WU a Zhanhu GUO. Structural characterization of lignin from *D. sinicus* by FTIR and NMR techniques. *Green Chemistry Letters and Reviews* [online]. 2019, **12**(3), 235–243. ISSN 17517192. Dostupné z: doi:10.1080/17518253.2019.1627428
- [195] MAINKA, Hendrik, Olaf TÄGER, Enrico KÖRNER, Liane HILFERT, Sabine BUSSE, Frank T. EDELMANN a Axel S. HERRMANN. Lignin - An alternative precursor for sustainable and cost-effective automotive carbon fiber. *Journal of Materials Research and Technology* [online]. 2015, **4**(3), 283–296. ISSN 22387854. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmrt.2015.03.004
- [196] JAHAN, M. Sarwar, D. A.Nasima CHOWDHURY, M. Khalidul ISLAM a S. M.Iqbal MOEIZ. Characterization of lignin isolated from some nonwood available in Bangladesh. *Bioresource Technology* [online]. 2007, **98**(2), 465–469. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2006.01.005
- [197] LI, Ming Fei, Shao Ni SUN, Feng XU a Run Cang SUN. Microwave-assisted organic acid extraction of lignin from bamboo: Structure and antioxidant activity investigation. *Food Chemistry* [online]. 2012, **134**(3), 1392–1398. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.037
- [198] GOSSELINK, R. J.A., A. ABÄCHERLI, H. SEMKE, R. MALHERBE, P. KÄUPER, A. NADIF a J. E.G. VAN DAM. Analytical protocols for characterisation of sulphur-free lignin. *Industrial Crops and Products* [online]. 2004, **19**(3), 271–281. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2003.10.008
- [199] FILIPPOV, M P, O LUKNÁR a R KOHN. Infrared spectra of the acetyl derivatives of pectin . I . Potassium salts of the citrus pectic acid with different degrees of acetylation. *Chem.Zvesti*. 1978, **32**(2), 211–217.
- [200] BUONO, Pietro, Antoine DUVAL, Pierre VERGE, Luc AVEROUS a Youssef HABIBI.

- New Insights on the Chemical Modification of Lignin: Acetylation versus Silylation. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* [online]. 2016, **4**(10), 5212–5222. ISSN 21680485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.6b00903
- [201] STEFKE, Barbara, Elisabeth WINDEISEN, Manfred SCHWANNINGER a Barbara HINTERSTOISSER. Determination of the weight percentage gain and of the acetyl group content of acetylated wood by means of different infrared spectroscopic methods. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, **80**(4), 1272–1279. ISSN 00032700. Dostupné z: doi:10.1021/ac7020823
- [202] ADEBAJO, Moses O. a Ray L. FROST. Acetylation of raw cotton for oil spill cleanup application: An FTIR and <sup>13</sup>C MAS NMR spectroscopic investigation. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2004, **60**(10), 2315–2321. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2003.12.005
- [203] NERÍN, C., L. TOVAR a J. SALAFRANCA. Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. *Journal of Food Engineering* [online]. 2008, **84**(2), 313–320. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.05.027
- [204] YEDRO, Florencia M., Juan GARCÍA-SERNA, Danilo A. CANTERO, Francisco SOBRÓN a M. José COCERO. Hydrothermal fractionation of grape seeds in subcritical water to produce oil extract, sugars and lignin. *Catalysis Today* [online]. 2015, **257**(Part 2), 160–168. ISSN 09205861. Dostupné z: doi:10.1016/j.cattod.2014.07.053
- [205] RODRÍGUEZ COUTO, S., A. DOMÍNGUEZ a A. SANROMÁN. Utilisation of lignocellulosic wastes for lignin peroxidase production by semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biodegradation* [online]. 2001, **12**(5), 283–289. ISSN 09239820. Dostupné z: doi:10.1023/A:1014392810649
- [206] CAZACU, Georgeta, Mirela CAPRARU a Valentin I. POPA. Advances Concerning Lignin Utilization in New Materials. In: Sabu THOMAS, P. M. VISAKH a Aji. P. MATHEW, ed. *Advances in Natural Polymers* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, Advanced Structured Materials, s. 255–312. ISBN 978-3-642-20939-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-20940-6
- [207] ESPINOZA ACOSTA, José Luis, Patricia Isabel TORRES CHÁVEZ, Benjamín RAMÍREZ-WONG, Luis Arturo BELLO-PÉREZ, Alejandro VEGA RÍOS, Elizabeth CARVAJAL MILLÁN, Maribel PLASCENCIA JATOMEA a Ana I. LEDESMA OSUNA. Mechanical, thermal, and antioxidant properties of composite films prepared from durum wheat starch and lignin. *Starch/Stärke* [online]. 2015, **67**(5–6), 502–511. ISSN 1521379X. Dostupné z: doi:10.1002/star.201500009
- [208] IGNAT, L., M. IGNAT, C. CIOBANU, F. DOROFTEI a V. I. POPA. Effects of flax lignin addition on enzymatic oxidation of poly(ethylene adipate) urethanes. *Industrial Crops and Products* [online]. 2011, **34**(1), 1017–1028. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2011.03.010
- [209] MOUSAVIOUN, P. a W. O.S. DOHERTY. Chemical and thermal properties of fractionated bagasse soda lignin. *Industrial Crops and Products* [online]. 2010, **31**(1), 52–58. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2009.09.001
- [210] BOERIU, Carmen G., Dominique BRAVO, Richard J.A. GOSSELINK a Jan E.G. VAN DAM. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products* [online]. 2004, **20**(2), 205–218. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2004.04.022
- [211] NÚÑEZ-FLORES, R., B. GIMÉNEZ, F. FERNÁNDEZ-MARTÍN, M. E. LÓPEZ-CABALLERO, M. P. MONTERO a M. C. GÓMEZ-GUILLÉN. Physical and functional

- characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. *Food Hydrocolloids* [online]. 2013, **30**(1), 163–172. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2012.05.017
- [212] CUSOLA, Oriol, Orlando J. ROJAS a M. Blanca RONCERO. Lignin Particles for Multifunctional Membranes, Antioxidative Microfiltration, Patterning, and 3D Structuring. *ACS Applied Materials and Interfaces* [online]. 2019, **11**(48), 45226–45236. ISSN 19448252. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.9b16931
- [213] WANG, Jing, Lingling TIAN, Baiwen LUO, Seeram RAMAKRISHNA, Dan KAI, Xian Jun LOH, In Hong YANG, G. Roshan DEEN a Xiumei MO. Engineering PCL/lignin nanofibers as an antioxidant scaffold for the growth of neuron and Schwann cell. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2018, **169**(May), 356–365. ISSN 18734367. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2018.05.021
- [214] ABDUL KHALIL, H.P.S., Chaturbhuj K. SAURABH, M.I. SYAKIR, M.R. Nurul FAZITA, Aamir BHAT, A. BANERJEE, H.M. FIZREE, Samsul RIZAL a Paridah Md TAHIR. Barrier properties of biocomposites/hybrid films. In: *Mechanical and Physical Testing of Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites* [online]. B.m.: Elsevier, 2019, s. 241–258. ISBN 9780081022924. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102292-4.00013-8
- [215] DHAR, Prodyut, Umesh BHARDWAJ, Amit KUMAR a Vimal KATIYAR. Poly (3-hydroxybutyrate)/cellulose nanocrystal films for food packaging applications: Barrier and migration studies. *Polymer Engineering & Science* [online]. 2015, **55**(10), 2388–2395. ISSN 00323888. Dostupné z: doi:10.1002/pen.24127
- [216] VANDEWIJNGAARDEN, Jens, Ruben WAUTERS, Marius MURARIU, Philippe DUBOIS, Robert CARLEER, Jan YPERMAN, Jan D'HAEN, Bart RUTTENS, Sonja SCHREURS, Nadia LEPOT, Roos PEETERS a Mieke BUNTINX. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)/Organomodified Montmorillonite Nanocomposites for Potential Food Packaging Applications. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2016, **24**(2), 104–118. ISSN 15662543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-016-0751-1
- [217] BANG, Gree a Seong Woo KIM. Biodegradable poly(lactic acid)-based hybrid coating materials for food packaging films with gas barrier properties. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2012, **18**(3), 1063–1068. ISSN 1226086X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiec.2011.12.004
- [218] KOVALCIK, Adriana, Michal MACHOVSKY, Zuzana KOZAKOVA a Martin KOLLER. Designing packaging materials with viscoelastic and gas barrier properties by optimized processing of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with lignin. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2015, **94**, 25–34. ISSN 13815148. Dostupné z: doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2015.07.001
- [219] CHAN, Clement Matthew, Luigi Jules VANDI, Steven PRATT, Peter HALLEY, Yiming MA, Guo Qiang CHEN, Desmond RICHARDSON, Alan WERKER a Bronwyn LAYCOCK. Understanding the effect of copolymer content on the processability and mechanical properties of polyhydroxyalkanoate (PHA)/wood composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* [online]. 2019, **124**(March), 105437. ISSN 1359835X. Dostupné z: doi:10.1016/j.compositesa.2019.05.005
- [220] LEMES, A. P., M. A. SOTO-OVIEDO, W. R. WALDMAN, L. H. INNOCENTINI-MEI a N. DURÁN. Effect of Lignosulfonate on the Thermal and Morphological Behavior of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Journal of Polymers and the*

- Environment* [online]. 2010, **18**(3), 250–259. ISSN 15662543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-010-0170-7
- [221] ANGELINI, Stefania, Pierfrancesco CERRUTI, Barbara IMMIRZI, Gabriella SANTAGATA, Gennaro SCARINZI a Mario MALINCONICO. From biowaste to bioresource: Effect of a lignocellulosic filler on the properties of poly(3-hydroxybutyrate). *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2014, **71**, 163–173. ISSN 18790003. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.07.038
- [222] WEIHUA, Kai, Yong HE, Naoki ASAKAWA a Yoshio INOUE. Effect of lignin particles as a nucleating agent on crystallization of poly(3-hydroxybutyrate). *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2004, **94**(6), 2466–2474. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.21204
- [223] KAI, Dan, Hui Moon CHONG, Li Ping CHOW, Lu JIANG, Qianyu LIN, Kangyi ZHANG, Huijie ZHANG, Zheng ZHANG a Xian Jun LOH. Strong and biocompatible lignin /poly (3-hydroxybutyrate) composite nanofibers. *Composites Science and Technology* [online]. 2018, **158**, 26–33. ISSN 02663538. Dostupné z: doi:10.1016/j.compscitech.2018.01.046
- [224] MA, Hongwei a Chang Whan JOO. Investigation of jute-lignin-poly (3-hydroxybutyrate) hybrid biodegradable composites with low water absorption. *Fibers and Polymers* [online]. 2011, **12**(3), 310–315. ISSN 12299197. Dostupné z: doi:10.1007/s12221-011-0310-2



## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3HB	hydroxybutyrát
3HHx	hydroxyhexanoát
3HV	hydroxyvalerát
a.u.	arbitrary units
ABS	akrylonitrilbutadienstyren
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AQ	antrachinon
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATR	attenuated total reflectance
CNC	celulózové nanokrystaly
DCP	dikumylperoxid
DSC	diferenční snímací kalorimetrie
EVA	ethylenvinylacetát
EVOH	ethylenvinylalkohol
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
GAE	ekvivalent kyseliny galové
GTR	rychlost přenosu plynu
HD-PE	vysokohustotní polyethylen
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým uhlíkovým řetězcem
LD-PE	nízkohustotní polyethylen
LLD-PE	lineární nízkohustotní polyethylen
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým uhlíkovým řetězcem
$m_{\text{rest}}$	zbytková hmotnost
$M_w$	molekulová hmotnost
P	koeficient propustnosti
P3HB	poly(3-hydroxybutyrát)
P3HB-3HHx	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyhexanoát)
P3HB-3HV	poly(3-hydroxybutyrate- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)
P3HB-4HB	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -4-hydroxybutyrát)
P3HB/PHA	směs poly(3-hydroxybutyrátu) a amorfního polyhydroxyalkanoátu
PA	polyamidy

PAN	polyakrylnitril
PBAT	polybutylen adipát-tereftalát
PBS	polybutylen sukcinát
PC	polykarbonát
PCL	polykaprolakton
PEN	polyethylennaftalát
PET	polyethylentereftalát
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHF	polyhydroxy mastné kyseliny
PLA	polymléčná kyselina
PMMA	poly(methylmethakrylát)
PP	polypropylen
PS	polystyren
PTFE	polytetrafluorethylen
PTT	polytrimethylentereftalát
PVA	polyvinylacetát
PVC	polyvinylchlorid
PVdC	polyvinylidenchlorid
SB	styren butadien
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým uhlíkovým řetězcem
SLE	extrakce kapalina-pevná látka
$T_c$	teplota krystalizace
$T_g$	teplota skelného přechodu
TGA	termogravimetrická analýza
$T_m$	teplota tání
$T_{max}$	teplota maximální degradace
$T_{onset}$	teplota počátku degradace